

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1961

N° 719

THÈSE
POUR LE
DOCTORAT EN MÉDECINE
(Diplôme d'État)

par

Serge COTTIN

Interne des Hôpitaux de Paris

Né le 25 Décembre 1928, à Soissons (Aisne)

Présentée et soutenue publiquement le 15 Juin 1961

**LES CHROMOSOMES DES CELLULES CANCEREUSES
EN CULTURE**

Président : M. F.-P. MERKLEN, Professeur

VIAU Maurice,
imprimeur, rue de Savenay, Nantes.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1961

N° 719

THÈSE
POUR LE
DOCTORAT EN MÉDECINE
(Diplôme d'État)

par

Serge COTTIN

Interne des Hôpitaux de Paris

Né le 25 Décembre 1928, à Soissons (Aisne)

Présentée et soutenue publiquement le 15 Juin 1961

**LES CHROMOSOMES DES CELLULES CANCEREUSES
EN CULTURE**

Président : M. F.-P. MERKLEN, Professeur



PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. AUBIN A., BÉNARD H., BULLIARD H., CADENAT F., CHABROL E., CHAMPY C., DEBRÉ R., GASTINEL P., GUILLAIN G., HALPHEN E., HAZARD R., HEUYER G., LANTUEJOUL P., LAROCHE G., LEVY-SOLAL E., LIAN C., LOEPER M., MARION G., MATHIEU P., MOCQUOT P., MONDOR H., MONOD R., MOREAU R., OLIVIER E., PASTEUR-VALÉRY-RADOT, PETIT-DUTAILLIS, RICHET C., STROHL A., TANON L.

DOYEN :

Léon BINET

ASSEESSEUR :

Jean VERNE

I. — PROFESSEURS

Anatomie
Anatomie pathologique
Anesthésiologie
Biochimie médicale

Professeur à titre personnel

MM. DELMAS A.
DELARUE J.
BAUMANN J.
JAYLE M.-F.
ETTORI J.
SCHAPIRA G.

Biologie appliquée à l'éducation physique
et aux sports

Biologie médicale

Professeur à titre personnel

Cancérologie médicale et sociale

Clinique carcinologique chirurgicale
(Necker)

CHAILLEY-BERT P.
FAUVERT R.
BOURLIERE F.
BERNARD J.

REDON H.

Cliniques chirurgicales (Beaujon, Cochin,
Hôtel-Dieu, Pitié, Saint-Antoine, Sal-
pêtrière, Tenon)

SICARD A.
N...
PATEL J.
CORDIER G.
GOSSET J.
MOULONGUET P.
LORTAT-JACOB J.-L.

Clinique de chirurgie infantile et ortho-
pédique (Enfants - Malades)

Clinique de chirurgie orthopédique et
réparatrice

Clinique de chirurgie cardio-vasculaire .

FÈVRE M.

MERLE D'AUBIGNÉ R.
GAUDART-D'ALLAINES
F. de

Clinique de chirurgie pleuro-pulmonaire
 Clinique endocrinologique
 Clinique de génétique médicale
 Clinique gynécologique
 Clinique des maladies cutanées et syphi-
 litiques
 Clinique des maladies des enfants
 Clinique des maladies infectieuses
 Clinique des maladies mentales et de
 l'encéphale
 Clinique des maladies métaboliques
 Clinique des maladies du sang
 Clinique des maladies du système ner-
 veux

Cliniques médicales (Boucicaut, Brous-
 sais, Cochin, Hôtel-Dieu, Pitié, Saint-
 Antoine)

Clinique médicale d'hydrologie thérapeu-
 tique et climatologie
 Clinique médicale propédeutique
 Clinique médico-sociale du diabète sucré
 et des maladies de la nutrition
 Clinique de neuro-chirurgie
 Clinique neurologique
 Cliniques obstétricales { Baudelocque...
 Foch
 Clinique obstétricale et gynécologique ..
 Clinique ophtalmologique
 Clinique oto-rhino-laryngologique
 Clinique de pédiatrie et de puériculture
 Clinique de pédiatrie sociale
 Clinique de pneumo-phtisiologie
 Clinique de psychiatrie infantile
 Clinique de rhumatologie médicale et
 sociale
 Clinique stomatologique

MATHEY J.
 DECOURT J.
 LAMY M.
 FUNCK-BRENTANO P.

DEGOS R.
 CATHALA J.
 MOLLARET P.

DELAY J.
 HAMBURGER J.
 MARCHAL G.

N...

LENE GRE J.
 SOULIE P.
 JUSTIN-BESANÇON L.
 BROUET G.
 BARIETY M.
 DREYFUS G.
 KOURILSKY R.

DEBRAY C.
 GENNES L. de

DEROT M.
 DAVID M.
 GARCIN R.

LACOMME M.
 MERGER R.

VARANGOT J.
 RENARD G.

AUBRY M.
 LELONG M.

MARIE J.
 BERNARD E.
 MICHAUX L.

COSTE F.
 DECHAUME M.

Clinique thérapeutique chirurgicale	N...
Clinique thérapeutique médicale	LEMAIRE A.
Clinique urologique	N...
Embryologie	GIROUD A.
Professeur à titre personnel	TUCHMANN-DUPLES-
	SIS H.
Histoire de la médecine et de la chirurgie	SEZE S. de
Histologie	VERNE J.
Hygiène et clinique de la première enfance	
Hygiène et médecine préventive	TURPIN R.
Professeur à titre personnel	JOANNON P.
Médecine du travail	DEPARIS M.
Médecine légale	DESOILLE H.
Microbiologie (bactériologie et virologie)	PIEDELIEVRE R.
Parasitologie	FASQUELLE R.
Professeur à titre personnel	GAILLARD H.
Pathologie chirurgicale	BRUMPT L.-C.
Professeur à titre personnel	COUVELAIRE R.
Pathologie exotique	LAURENCE G.
Pathologie expérimentale et comparée .	LAVIER G.
Pathologie médicale	MERKLEN F.-P.
Pathologie respiratoire	MILLIEZ P.
Pathologie et thérapeutique générales .	TURIAF F.
Pharmacologie	BOUDIN G.
Professeur à titre personnel	CHEYMOL J.
Physiologie	M ^{lle} LEVY J.
Professeur à titre personnel	MM. BINET L.
Professeur à titre personnel	BARGETON D.
Physiologie et pathologie obstétricale ..	PARROT J.
Physique médicale	LEPAGE F.
Professeur à titre personnel	DOGNON A.
Radiologie médicale	DJOURNO A.
Technique chirurgicale et chirurgie expérimentale	DESGREZ H.
Thérapeutique	LÉGER L.
	CONTE M.

II. — PROFESSEURS SANS CHAIRE, PROFESSEURS AGRÉGÉS,
MAITRES DE CONFÉRENCE AGRÉGÉS

Anatomie

MM. CABROL C.
COUNAUD C.
OLIVIER G.

Anatomie pathologique

M^{lle} GAUTHIER-VILLARS P. (Pr. s. ch.)
MM. GOUYGOU C.
ORCEL L.
PAILLAS J.

Anesthésiologie

M. VOURC'H G.

Bactériologie

MM. BARBIER P.
CHRISTOL D.
TOURNIER P.

Biochimie médicale

MM. DESGREZ P. (Pr. s. ch.)
POLONOSKI J. (Mte Conf.)

Biologie appliquée à l'éducation
physique et aux sports

M. PLAS F.

Carcinologie

MM. DENOIX F.
MATHE G.

Dermato-syphiligraphie

M. DUPERRAT B.

Electro-radiologie

M. LEDOUX-LEBARD G.

Hématologie

MM. BILSKI-PASQUIER G.
DAUSSET J.

Histologie

MM. COUJARD R. (Pr. s. ch.)
MAROIS M.
RACADOT J.

Hydrologie

M. CORNET A.

Hygiène

M. BOYER J. (Pr. s. ch.)
M^{me} CORRE-HURST L.

Maladies infectieuses

MM. BASTIN R.
DUPONT V.

Médecine légale

MM. DEROBERT L., Pr. s. ch.
HADENGUE A.
FOURNIER E.
GUENIOT M.

Médecine du travail

M. ALBAHARY C.

Neurologie

M. LHERMITTE F.

Obstétrique

MM. GRANJON A.
HERVET E.
LE LORIER G.
MORIN P.
MUSSET R.
ROBEY M.
THOYER-ROZAT J.

Ophtalmologie

MM. BREGEAT P.
SARAUX H.

Orthopédie

MM. JUDET R.
RAMADIER J.

Oto-rhino-laryngologie

M. DEBAIN J.

Parasitologie

M. CHABAUD A.

Pathologie chirurgicale

MM. BARCAT J.
BINET J.-P.
CAUCHOIX J.
CHATELIN C.-L.
DUBOST Ch.
DUBOST Cl.
FAUREL J.
FLABAUD F.
GERMAIN A.
LOYGUE J.
MERCADIER
PERROTIN J.
ROBERT H.
THOMERET G.

Pathologie exotique

M. SCHNEIDER J.

Pathologie expérimentale

MM. CROSNIER J.

HARTMANN L.

LOEPER J.

MAURICE J.

RICHET G.

Pathologie médicale

MM. AUSSANAIRE M.

BOUR H.

BOUVIER J.

BOUVRAIN Y.

BRICAIRE H.

BRISSAUD H.

BROCARD H.

BUGE A.

CASTAIGNE P. (M. Conf.)

CATINAT J.

CONTAMIN F.

COURY C.

FREZAL J.

HOUSSET E.

LAROCHE Cl.

LESOBRE R.

MACREZ C.

NICK J.

PEQUIGNOT H. (Pr. s. ch.)

ROYER P.

WOLFROM R.

Pédiatrie-puériculture

MM. JOSEPH R.

MANDE R.

MOZZICONACCI P.

POLONOVSKI C.

ROSSIER A.

Pharmacologie

MM. BOISSIER J.

LECHAT P.

Physiologie

M. DEJOURS P.

Physique médicale

MM. GOUGEROT L. (M. Conf.,
Pr. s. ch.)

KELLERSHON

Pneumo-ptisiologie

M. KREISS B.

Psychiatrie

M. PICHOT P.

Psychiatrie infantile

M. DUCHE D.

Rhumatologie

M. DELBARRE F.

Stomatologie

M. CERNEA P.

M^{me} CHAPUT A. (M. C. Ag.)

M. GRELLET M.

Thérapeutique

MM. CHASSAGNE P.

LAMOTTE M.

Urologie

M. QUENU L.

III. — PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGREGÉS
CHARGÉS DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE
à titre permanent

Anatomie

M. DEBEYRE

Clinique chirurgicale

MM. ABOULKER P.

AMELINE A., Pr. s. ch.

HUGUIER J.

OLIVIER C.

PADOVANI P.

POILLEUX F.

ROUX M.

VERNE J.-M.

Clinique médicale
MM. DOMART A.
PERRAULT M.
RAMBERT P.
THIEFFRY S.

Clinique obstétricale
MM. GRASSET J.
MAYER M.
RAVINA J.

Clinique ophtalmologique
MM. DESVIGNES P.
OFFRET G.

Clinique oto-rhino-laryngologique
M. MADURO R.

Clinique pédiatrique et puéri-
culture
M. LAPLANE R.

Clinique psychiatrique
M. BARUK H.

Clinique urologique
M. KUSS R.

Médecine légale
M. GAULTIER

IV. — PROFESSEURS DÉTACHÉS DANS LES UNIVERSITÉS ÉTRANGÈRES

Bactériologie MM. HAUDUROY P., Pr. s. ch.
Pathologie chirurgicale RUDLER J., Pr. s. ch.

V. — CHARGÉS DE COURS D'HYGIÈNE SCOLAIRE ET UNIVERSITAIRE

MM. BOLTANSKI E. et LAUNAY C.

VI. — SECRÉTARIAT

Secrétaire général de la Faculté M. LENA J.
Secrétaires M^{me} BEURLAND H.
M^{lle} CHANTREUIL G.
M^{me} ROCHE L.

VII. — BIBLIOTHÈQUE

Conservateur en chef M. le Dr HAHN A.
Conservateur M^{lle} DUMAITRE P.
Bibliothécaires M^{mes} CONTET J., FORGET F.
M^{lles} LAURENT H., LE NOIR
G., QUIEVREUX E.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A ma Mère,

A mon Père,

A ma Femme,

A mes Enfants

et à mes Amis.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR F.P. MERKLEN,

qui m'a initié à la dermatologie ; il m'a ouvert
très tôt son laboratoire et dirigé de ses conseils
éclairés vers les travaux qui ont abouti à cette
thèse.

En témoignage de ma profonde reconnaissance.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR M. BARIETY,

en souvenir de l'année passée dans son service
et de l'enseignement éminent qu'il m'a prodigué.

En délicate expression de mon admiration
et de ma gratitude.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR M. LAMY,

à qui je dois l'essentiel de mes connaissances
pédiatriques. En remerciement de l'accueil si
bienveillant qu'il m'a toujours accordé dans son
service et ses laboratoires.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR COSTE,

en témoignage de mon actuel dévouement.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR F. TURIAF,

en reconnaissance de l'enseignement clinique
qu'il a bien voulu me dispenser avec autant
de fougue que de généreuse sympathie.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR M. DEPARIS,

qui m'a toujours accueilli avec sollicitude
et reste pour moi l'exemple
d'une médecine profondément humaine.

En témoignage de ma déférence.

A mes Maîtres d'Externat :

MONSIEUR LE PROFESSEUR H. MONDOR,

MONSIEUR LE PROFESSEUR L. LEGER,

MONSIEUR LE DOCTEUR R. EVEN,

MONSIEUR LE DOCTEUR F. LAYANI,

MONSIEUR LE PROFESSEUR Et. BERNARD.

A MONSIEUR LE DOCTEUR J. DE GROUCHY,
qui m'a aidé de ses compétences dans la réalisation
de ce travail.

A MONSIEUR LE DOCTEUR P. BERTAUX,
A MONSIEUR LE DOCTEUR Cl. MIKOL,
A MONSIEUR LE DOCTEUR J. PAUPE,
A MONSIEUR LE DOCTEUR J.-P. MAURAT,

pour leur aide sympathique et amicale.

INTRODUCTION

Depuis les premiers travaux de Harrison en 1907, qui obtint le développement d'axones à partir d'un fragment de moelle épinière d'embryon de grenouille explanté in vitro, la technique de culture des tissus a connu un grand essor.

Née du perfectionnement de méthodes utilisées en embryologie dès la fin du XIX^e siècle, la culture de tissu a permis nombre de progrès dans des disciplines fort différentes.

En virologie, la culture de tissu s'est révélée fructueuse et rapidement indispensable. La première application de cette méthode a été la culture du virus du Sarcome de Rous sur fibroblastes de poulet par Carrel et Burrough en 1910. Puis Steinhart, Israeli et Lambert cultivèrent en 1913 le virus vaccinal sur tissu cornéen explanté, et Levaditi, la même année, a cultivé le virus poliomyélitique sur ganglion spinal de singe explanté après inoculation cérébrale.

La virologie a trouvé dans la culture des tissus la technique qui a permis son développement actuel, et l'isolement d'un grand nombre de virus dont on ne soupçonnait même pas l'existence, puisque certains d'entre eux (Orphan virus; virus en quête de maladie, Werner, 1956) ont été découverts avant même que leur rôle pathogène ait pu être précisé.

La conclusion de ces recherches devait être la fabrication et l'emploi, sur une grande échelle, du vaccin anti-poliomyélitique, en attendant qu'une meilleure connaissance de la biologie des virus nous forge d'autres armes thérapeutiques.

La bactériologie elle-même a profité de cette technique, puisque le bacille de Hansen aurait pu être cultivé sur fibroblaste

humain, puis passé sur des milieux plus conventionnels (Ranadive K.J., Neurukar R.V. et Khanolkar V.R., 1958; Bapat C.V., Kamal J., Ranadive K.J. et Khanolkar V.R., 1959).

La biochimie a utilisé largement la culture de tissu. Dans ce domaine, l'obtention de milieux de culture chimiquement définis et non plus naturels s'est imposée au chercheur dès 1912 (Lewis W.H., Lewis M.R.). Nous dirons ailleurs ce qu'il faut penser de ces milieux entièrement synthétiques de composition bien précisée à l'heure actuelle grâce aux travaux de Morgan, Eagle, Cailleau, etc. Ils ont permis d'établir les besoins en acides aminés et vitamines des différentes souches cellulaires, et d'étudier les effets particuliers de certains acides aminés: cystine (Morgan et Morton, 1955); phényl-alanine (Eagle et Piel, 1957); glutamine et acide glutamique (Eagle et Oyama, 1956^a; Levintow, 1957); les effets des carences vitaminiques ont été précisés (Eagle, 1955^b). On a pu ainsi étudier également la synthèse de l'acide désoxyribonucléique (Le Page, 1956; Gelfant, 1958; Mellors, 1956; Richards, 1956).

L'immunologie elle-même a profité de la technique de culture des tissus pour étudier la formation des anticorps (Fishmann, 1959; Enders, 1954; Harris, 1954; Stevens, 1958). Les recherches devaient conduire à la mise en évidence, sur les cellules épidermiques puis sur les cellules Hela, des antigènes des groupes sanguins (Ash Hurit, Bedford, 1956; Kelus, Gurner, 1959; Hogman, 1960). Elles devaient enfin rejoindre le problème très général de l'immunobiologie des greffes et des tumeurs: étude de sérums anti-cellules cancéreuses (Goldstein, Myrvic, 1958; Gorner, 1956), études plus générales sur l'immunité tumorale (Barret, 1958).

L'embryologie qui est à l'origine des cultures de tissus devait tirer grand parti de la technique, mais utiliser surtout la culture d'organes (Fell, 1931; Gaillard, 1955; Trowell, 1955 a et b). L'endocrinologie s'est également emparé de ces possibilités (Schaberg, 1958; Rosse, 1959; Fautrez, 1960).

La cytologie a enfin beaucoup bénéficié de cette technique. L'observation *in vitro* des mouvements, de la croissance des cellules vivantes, de leurs mitoses, a conduit à une meilleure connaissance de ces phénomènes. Les travaux d'Osgood et de toute son école ont précisé bien des inconnues de la cytologie sanguine (Tanzer, 1960).

Surtout ces cultures ont permis, par des artifices complexes, de mettre en évidence les chromosomes avec une précision jamais atteinte, et de les observer, les compter et les classer dans les meilleures conditions techniques.

Pour se borner aux recherches faites chez l'homme; il faut rappeler que dès 1912, mais sans recourir à la culture cellulaire, De Winiwarter avait compté 47 chromosomes dans la spermatogonie en métaphase; Wieman, en 1917, a rapporté l'existence des gonosomes X et Y, puis Evans, en 1918, a estimé à 48 le nombre diploïde dans les spermatogonies. Painter, en 1921, fait la relation entre Y et le sexe mâle et confirme le nombre de 48 chromosomes.

En 1952 encore, dans une culture de peau d'embryon humain, Hsu compte toujours 48 chromosomes. Aussi est-ce une surprise générale quand, en 1956, Tjio et Levan annoncent le nombre de 46 chromosomes dans les fibroblastes obtenus par culture de poumon provenant de quatre embryons humains avortés. Ford et Harmerton confirment ces résultats la même année dans des cellules d'explants testiculaires. Depuis, ce nombre diploïde de 46 chromosomes pour les cellules humaines somatiques normales est universellement admis car vérifié à 99 pour 100 près des cellules étudiées. Face à cette unanimité, il ne restait que les résultats de Kodani (1958) qui, variant de 45 à 48 chromosomes, étaient vraiment aberrants.

Ces recherches devaient conduire à la mise en évidence d'aberrations chromosomiques au cours de certaines maladies humaines. La première de ces découvertes, réalisée par culture d'explants de fascia lata, est l'existence d'une anomalie chromosomique dans le mongolisme; elle est due à Lejeune, Turpin et Gautier, et confirmée par Jacobs et coll., enfin par Book et coll. au cours de la même année 1959. Cette anomalie est une trisomie, c'est-à-dire la présence d'un même chromosome à trois exemplaires au lieu de deux normaux dans le caryotype de chaque cellule.

Depuis cette date, les découvertes se multiplient, de syndromes malformatifs au cours desquels on observe une anomalie de l'un ou l'autre des chromosomes somatiques. Cette question est encore en plein remaniement et on ne peut en faire qu'un bilan provisoire (Gagnon, 1960).

Les aberrations peuvent toucher également les chromosomes

sexuels et l'on connaît bien actuellement la formule du syndrome de Turner, XO, et du syndrome de Klinefelter, XXY; la formule XXX a été rencontrée dans des conditions cliniques variables (femme normale; troubles des règles; arriération mentale); on a rapporté encore deux cas de syndrome de Klinefelter avec troubles mentaux de formule XXXY. Il s'en faut cependant que toutes les anomalies sexuelles correspondent à un trouble chromosomique et, au contraire, les dysgénésies gonadiques et le testicule féminisant ont une formule mâle normale XY.

L'existence d'hermaphrodites vrais, dont certaines cellules sont de formule XY et d'autres de formule XO, sera le seul exemple cité de ces mélanges de cellules à caryotypes différents chez le même individu, que l'on nomme « mosaïque ».

Cette nouvelle technique perfectionnée de mise en évidence des chromosomes en culture de tissu devait faire reprendre l'étude des chromosomes des cellules de cancer humain et des cellules de souche normale et cancéreuse, dans le but d'y rechercher ou bien un caractère particulier qui permette éventuellement un diagnostic de certitude dans les cas où l'histologie et la cytologie statiques sont douteuses dans leurs conclusions, ou bien des données permettant d'éclaircir la génétique particulière de ces cellules.

Il est apparu enfin, à la lumière des résultats obtenus par culture continue de cellules issues de tissus normaux, que ces cellules se modifiaient au cours des repiquages successifs et prenaient des caractères histologiques, biochimiques et chromosomiques intermédiaires à ceux des cellules normales et des cellules cancéreuses (Moore, Southam, 1956; Moore, 1957). Ces modifications obtenues sans autre artifice que des conditions de culture imparfaites posent alors un double problème: d'une part, le problème très général de la genèse des cellules cancéreuses et, d'autre part, le problème connexe de savoir si certains caractères classiquement attribués aux cellules cancéreuses sont bien liés à l'état cancéreux et pas seulement aux conditions extérieures de vie ou de culture.

TECHNIQUES GÉNÉRALES DE CULTURE CELLULAIRE APPLIQUÉES A L'ÉTUDE DES CHROMOSOMES

La culture de cellule exige des moyens particuliers actuellement bien mis au point par cinquante ans de pratique et de recherches spécialisées.

I. — LES RÉCIPIENTS

Actuellement, le récipient le plus utilisé pour l'observation cytologique est un tube de verre de 170×17 mm. comportant à son extrémité un méplat où peut se loger une lamelle microscopique de 12×32 mm. sur laquelle pousseront les cellules.

Ce tube est utilisé aussi bien pour la culture en explants que pour la culture de cellules de souche et permet d'observer la pousse cellulaire à l'objectif à faible grossissement, lorsque le tube est placé, méplat vers le haut, sur la platine du microscope.

Il doit être, comme toute la verrerie utilisée (pipettes, flacons divers, tubes à centrifuger), fait de verre neutre ou de verre « dur », inerte au contact des milieux et, pour cette raison, choisi en pyrex. Le nettoyage a une importance considérable: la surface du verre doit être parfaitement propre pour permettre l'adhérence et la pousse des cellules. Le mélange sulfo-chromique et les produits à base de Teepol sont classiquement proscrits au profit du savon ordinaire ou de cristaux de soude. Le rinçage doit être minutieux, répété et terminé à l'eau distillée. Malgré ces précautions, certains récipients se révèlent impropres à la culture au premier essai. Les plus récentes études font intervenir comme facteur de l'adhérence des cellules au verre, les charges électriques négatives et la quantité d'ions Na^+ disponibles à la surface du verre, enfin la concentration en ion Ca^{++} du milieu (Rappaport, Poule, 1960; Rappaport, Bishop, 1960; Weiss, 1960).

Les bouchons sont faits de polyéthylène ou de caoutchouc blanc réputé atoxique. Avant leur première utilisation, ils doivent être bouillis longtemps dans l'eau.

La stérilisation de ces éléments se fait à l'autoclave. Dans le cas où l'on utilise le four Poupinel pour stériliser la verrerie, il faut se garder de la boucher provisoirement avec du coton, comme on le fait en bactériologie. Les goudrons libérés par la carbonisation éventuelle de ce dernier se condensent au refroidissement sur le verre et sont très toxiques pour les cellules, même à l'état de trace. Aussi préfère-t-on pour cet usage le papier d'aluminium.

Nous ne ferons que signaler l'existence de chambres de perfusion isothermiques permettant l'examen continu des cellules en croissance, et même la prise d'un film microcinématographique en contraste de phase. (Robineaux et Barski, 1956).

II. — LES MILIEUX

Leur composition est variable, différente selon le type de culture ou la souche cellulaire entretenue. Schématiquement, ils associent des solutions salines, des solutions d'acides aminés et de vitamines, du sérum sanguin, de l'extrait embryonnaire de poulet, et ceci en proportions variables.

Les solutions salines

Elles ont peu varié depuis le glycosol de Carrel et surtout la solution de Tyrode. Toutes comportent un certain nombre de constituants de rôle défini.

Le chlorure de sodium, le chlorure de potassium, les sels de calcium et de magnésium assurent la pression osmotique de la solution et l'isotonie par rapport au plasma. Cette pression doit se maintenir aux environs de 310 milliosmoles, ce qui correspond à un abaissement du point cryoscopique à $-0^{\circ},62$. Les écarts en moins sont mieux supportés que les écarts en plus, aussi est-il sans inconvénient de faire un milieu légèrement hypotonique, surtout si l'on prévoit que, lors du séjour des tubes à l'étuve, une condensation d'eau se forme à leur paroi supérieure qui tend à élever la pression osmotique du milieu présent au fond du tube.

Toutes ces solutions comportent un système tampon assurant au milieu un pH de 7,2 à 7,4. Il peut s'agir d'un tampon essentiellement bicarbonaté, avec une très petite quantité de phosphate monosodique, comme dans la solution de Earle (1943). Mais ceci oblige à cultiver les cellules sous atmosphère à teneur constante de CO_2 pour éviter des variations importantes de pH. Dans la solution de Hanks (1949), le système tampon est mixte et comporte

des phosphates monopotassique et disodique en quantité notable, et un tampon bicarbonate. Swim et Parker (1955) ont décrit des tampons non bicarbonatés utilisables en culture de tissu.

Composition des solutions salines utilisées en culture cellulaire

	Glucosol	Earle 1943	Hanks 1946
ClNa	8 g.	6,80 g.	8 g.
ClK	0,20	0,40	0,40
CaCl ² anhydre	0,20	0,20	0,14
MgCl ²	0,10	—	—
MgSO ⁴ , 7H ² O	—	0,10	0,20
NaH ² PO ⁴ , H ² O	0,05	0,125	—
Na ² H PO ⁴ , 2H ² O	—	—	0,06
K H ² PO ⁴	—	—	0,06
Glucose	1 g.	1 g.	1 g.
NaH CO ³	—	2,20	0,35
Rouge de Phénol (Indicateur coloré)	—	0,05	0,02

pour 1.000 cc. d'eau bidistillée.

Le pH du milieu est constamment contrôlé grâce à la présence de Rouge de Phénol (phénol-sulfone-phtaléine) qui, de rouge, vire à l'orange et au jaune en cas d'acidité trop marquée. La marge de pH compatible avec la vie des cellules semble aller de 6,6 à 7,8, mais il n'est pas exclu que des variations importantes se traduisent sans mort cellulaire par des altérations définitives de la lignée (Puck, Ciecura, 1958).

Toutes les solutions utilisées contiennent du glucose comme aliment cellulaire énergétique. La quantité en est assez uniforme et fixée à 1 g./1.000 cc. pour presque toutes les solutions proposées. Mais certains milieux artificiels en contiennent jusqu'à 3 g./1.000 cc.

Les solutions d'acides-aminés et de vitamines

Leur présence est nécessaire à la réussite de la culture. Ils proviennent de produits naturels ou de solutions synthétiques.

Les *produits naturels* sont les plus utilisés en culture de tissu à visée cytologique. Ils ont en effet l'avantage d'un prix de revient très abordable et d'une grande facilité de préparation.

Il s'agit essentiellement d'hydrolysats de protéine ou d'extraits d'organes lyophilisés. On a ainsi recommandé l'utilisation d'un ultra-filtrat de sérum de cheval (Sanford, Waltz, 1952) ou de bovin (Borowski, 1955), d'hydrolysat de lactalbumine (Melnick, Riordan, 1952) ou de caséine (Lépine, Slizewicz, 1956). On a proposé d'enrichir le milieu d'extraits de levure de bière comme vecteur de vitamines. Enfin Morgan a signalé les bons résultats obtenus par l'adjonction d'extraits de foie total (1955).

Ces milieux donnent toute satisfaction pour la pratique courante, la culture d'explants, le maintien des souches, la cytologie habituelle et en particulier la culture dont le but est la mise en évidence des chromosomes.

Dans le but d'obtenir des milieux de composition chimiquement connue, des travaux considérables ont conduit à la définition de *solutions synthétiques d'acides-aminés et de vitamines* nécessaires à la croissance des cellules de souche (Eagle, 1955^a et 1955^b, 1955^d; 1956^a et 1956^b; Eagle et Oyama, 1957^b) (Swim et Parker, 1958).

Les vitamines nécessaires sont surtout les vitamines du groupe B et peuvent être fournies avantageusement sous forme du coenzyme correspondant (Eagle, 1956^c). Les autres vitamines sont présentes dans la plupart des solutions proposées. Il est remarquable que certaines cellules n'ont pas besoin d'inositol, et en fournissent même aux cellules qui en exigent lorsqu'elles sont cultivées en symbiose (Eagle, 1959).

Les acides-aminés nécessaires doivent être fournis sous leur forme (l). Ils sont au nombre de 20 dans le milieu 199 de Morgan (1950). Ce sont: l'arginine, l'histidine, la lysine, le tryptophane, la phényl-alanine, la méthionine, la sérine, la thréonine, la leucine, l'isoleucine, la valine, les acides glutamique et aspartique, l'alpha-alanine, la proline, l'hydroxyproline, la glycine, la glutamine, la tyrosine, la cystine. La cystéine et le glutathion sont ajoutés dans une solution différente au moment de l'emploi. En réalité, des milieux plus récemment proposés sont de composition plus simple (milieu 703, Healy, Fischer, 1954); milieu 858, Healy, 1955; milieu M 150, Morgan et Campbell, 1955; milieu NCTC 109, Mc Quilken et coll. 1957).

C'est à partir de tels milieux, composés soit pour des recherches biochimiques, soit pour le maintien de cellules en survie en l'absence de sérum pour des recherches virales, que l'on a cherché à définir le rôle du sérum ajouté aux milieux depuis les premières

expériences, et indispensable aux cultures de longue durée, du moins dans la très grande majorité des cas.

Le sérum

Il est utilisé dans presque tous les milieux où sa présence s'avère indispensable à la culture prolongée de la plupart des cellules.

L'utilisation de *sérum homologue* a, depuis les débuts, toujours été recommandée, mais le recours au *sérum hétérologue* s'impose lorsqu'on ne peut recueillir une quantité suffisante de sérum homologue (cas, en particulier, des cultures de fibroblastes de souris).

On s'aperçut très vite que des sérums provenant d'individus différents montraient des qualités variables au regard de la pousse cellulaire qu'ils permettaient d'obtenir. Déjà, en 1922, Carrel, essayant de savoir par quel phénomène ces différences s'expliquaient, a noté que le sérum chauffé à 60°C. perdait ses qualités favorables, que le sérum d'animaux jeunes était plus efficace que celui d'animaux âgés, et a postulé l'existence d'un facteur de croissance abondant dans le sérum d'animaux non encore adultes, et d'un facteur d'inhibition de la croissance lié probablement à la fraction lipidique du sérum.

De nombreux expérimentateurs ont essayé de clarifier cette question.

Recherchant quelle fraction du sérum était indispensable, Jacquez et Barri (1951) ont montré que le facteur favorisant la croissance persistait dans le plasma du sang de cordon desséché après extraction lipidique, et qu'il était associé à une fraction euglobulinique du sérum. Healy (1952) envisage le rôle de certains métaux présents dans le sérum à l'état de trace.

Surtout Eagle (1955) note que les fractions I, II et III de Cohn sont inactives et que les fractions IV et V (alpha-globulines et albumines) sont faiblement actives. Sanford (1955) constate que les plus grosses molécules de globulines et les gamma-globulines du sérum de cheval représentent la fraction la plus active du sérum; les autres fractions sont plus faiblement actives. Evans et Bryant (1954) avaient signalé que l'albumine purifiée est moins active que le sérum total. Enfin, Fishel, Puck et Sata (1957) ont montré que le sérum d'animaux nouveaux-nés ou de fœtus est riche en une substance alpha-globulinique appelée « fœtine », douée d'activité anti-trypsique et favorisant l'adhérence des cellules au verre.

Malheureusement, toutes ces expériences sont entachées du fait que le fractionnement des protéines a pu les dénaturer (Vann, 1956).

Ainsi, la présence de protéines est nécessaire à la pousse cellulaire. Mais il n'y a pas de preuves de l'utilisation directe des protéines par les cellules qui, d'ailleurs, sont incapables de les dégrader faute des enzymes protéolytiques nécessaires. Le rôle des protéines n'est pas non plus purement physique, car leur remplacement par des macromolécules inertes (Dextran) est inefficace (Evans, Bryant, 1954). La dernière hypothèse est que les protéines libèrent dans le milieu des polypeptides utilisables par les cellules. Winnick (1953) a montré que les cellules étaient capables d'utiliser des polypeptides et Eagle (1955^e) a démontré l'utilisation des dipeptides.

Hanks (1948) avait montré que la croissance du muscle d'embryon de poulet en présence de sérum ultra-filtré était favorisée par la peptone de Witte, produit de la digestion incomplète de la fibrine. Ehrensward et Fischer (1949) avaient émis l'hypothèse que le peptide ou bien libérait progressivement un acide-aminé consommé dans le milieu, ou bien contrebalançait l'effet nocif de l'excès temporaire d'un acide-aminé. Toutes ces recherches devaient aboutir à la constitution de milieux dépourvus de protéines permettant la pousse continue de la souche L de fibroblastes de souris depuis maintenant cinq ans. Le milieu de Waymouth (1956) comporte ainsi en remplacement du sérum: 50 mg. d'albumine de bœuf purifiée et 500 mg. de bacto-peptone (Difco) pour 100 cc. Dans ce mélange, c'est surtout la peptone qui est indispensable.

Certains sérums, et particulièrement certains sérums humains, se révèlent non seulement incapables d'assurer la pousse cellulaire, mais entraînent la mort de la culture. Ce pouvoir « toxique » des sérums est un écueil que l'on évite en utilisant du sérum d'animaux jeunes ou en mélangeant plusieurs sérums en provenance d'adultes dans le but de diluer l'éventuelle toxicité de l'un d'eux.

Cette propriété « toxique » est un phénomène encore mal analysé. Elle semble liée à la fraction lipidique du sérum. Simms, Parshley et Pitt, en 1947, ont vu dans les cellules de la souche L cultivées en présence de sérum de poulet, des granulations lipidiques dans le protoplasme, dont l'apparition précédait la mort cellulaire. Le sérum chauffé était moins nocif, mais les granulations cytoplasmiques persistaient. Ils en vinrent à décrire l'existence de

lipfanogènes dans la fraction lipidique du sérum et d'antilipfanogènes dans la fraction albuminique, ces derniers étant respectés par le chauffage du sérum à 60°C.

Cailleau et coll. (1957) ont retrouvé les mêmes altérations cellulaires dues aux sérums toxiques et constaté que ces derniers étaient précisément les plus riches en lipides.

Cette explication de la « toxicité » des sérums est plausible, mais elle demande confirmation. En pratique, on se contente d'éliminer par un test préalable au contact d'une culture jeune les sérums impropres à la pousse cellulaire, sans rechercher si cette incapacité tient à des qualités chimiques ou immunologiques particulières ou à la présence fortuite d'un virus de rencontre.

L'extrait embryonnaire et le liquide amniotique

L'extrait embryonnaire de poulet employé lui aussi dès l'origine, est un milieu biologique extrêmement complexe. Il apporte des acides aminés, des vitamines, des polypeptides. Rosenberg (1953) a identifié les constituants de son ultrat-filtrat pour les remplacer dans le milieu de culture. Bryant, Earle et Peppers ont montré que l'ultra-centrifugation et la présence d'hyaluronidase favorisaient la filtration de l'extrait sans perte d'efficacité pour celui-ci. Kutsky (1953 et 1954) attache une certaine importance à la fraction nucléo-protéinique de cet extrait.

Il est utilisé habituellement pour favoriser la pousse d'explants primaires à un taux minime dans le milieu.

On le prépare par broyage d'embryons de poulet prélevés aseptiquement au neuvième jour d'incubation, en présence d'un volume égal de solution de Earle ou de Hanks. Par centrifugation, on élimine les débris cellulaires pour recueillir le surnageant.

Des extraits d'organes ou de tumeurs fabriqués selon la même technique sont utilisés pour favoriser le début de la pousse des explants primaires (Doljanski, Hoffman, 1942).

Le liquide amniotique de bovidé constitue également un bon milieu de maintien et entre dans la composition de milieux complexes (Malherbe, 1954; Thomas et Thiery, 1953). Il est prélevé stérilement aux abattoirs par des laboratoires spécialisés.

Telles sont les substances biologiques que l'on incorpore habituellement aux milieux de culture.

Les antibiotiques

Ils ont grandement facilité les manipulations et particulièrement la culture en explant primaire en diminuant le nombre des contaminations. On utilise habituellement la Pénicilline (100 à 2.000 unités par cc.), la Streptomycine (50 à 100 microgr. par cc.) et la Nystatine (50 à 100 unités par cc.). Mais tout autre antibiotique peut être ajouté en concentration convenable.

III. — *LES TYPES DE CULTURE UTILISÉS*

Ils sont au nombre de deux :

- la culture en explants de tissus fraîchement prélevés,
- la culture par repiquages successifs des cellules de souche.

La culture en explants primaires se pratique à partir de tissu normal ou cancéreux fraîchement prélevé.

Le prélèvement doit s'entourer de précautions d'asepsie rigoureuses. On peut prélever, comme tissu sain, du derme ou un fragment d'aponévrose, dont les fibroblastes poussent facilement. Les prélèvements tumoraux doivent être faits en une zone normalement vascularisée et non nécrosée, pour avoir quelque chance de pousser.

Le fragment prélevé est recueilli dans une boîte de Pétri contenant une compresse imbibée de solution de Hanks et portée au laboratoire dans un bref délai. Eventuellement, on pourrait conserver à 4°C dans les conditions ci-dessus le fragment biopsique pour ne le mettre en culture que le lendemain, mais cette technique ne semble pas préférable.

Pour la mise en culture, on découpe au bistouri des fragments cubiques de 3 mm. de côté environ, à bords nets. On les pose alors sur une lamelle microscopique placée par avance au fond d'un tube dit de Barski et enduite d'une fine couche de plasma de coq (obtenu par centrifugation de sang recueilli à une veine de l'aile et hépariné à raison de 10 unités internationales pour 8 à 10 cc. de sang). On place ainsi trois explants par lamelle et on ajoute une goutte d'extrait embryonnaire de poulet. Le tube est alors mis à l'étuve à 37°C pour une heure environ. Au bout de ce délai, le plasma est coagulé, fixant les explants à la lamelle et l'on peut ajouter le milieu sans risque de les déplacer. Le milieu comporte cinq parties de solution de Hanks, cinq parties de sérum humain du groupe AB et deux parties d'extrait embryonnaire, et l'on en répartit environ 1,5 cc. par tube. Le tube est alors reporté définitivement à l'étuve.

La croissance apparaît après 43 heures sous forme d'une couronne rayonnante de cellules d'aspect fibroblastique. Lorsque la pousse est jugée suffisante, c'est-à-dire en 3 à 6 jours, on décolle doucement l'explant (que l'on peut d'ailleurs repiquer dans les mêmes conditions après avoir avivé ses bords) et la pousse cellulaire se poursuit à partir de la couronne, envahissant l'espace laissé libre par l'enlèvement de l'explant.

La culture de cellules de souche est très différente dans son principe. Ces cellules, de provenance diverses, de tissu normal ou cancéreux, sont entretenues en culture par repiquages successifs et poussent directement sur la surface du verre, sans interposition de plasma coagulé.

Le repiquage est facile : on détache la pellicule cellulaire de la culture mère grâce à l'action d'une solution de trypsine ou par l'effet de l'éthylène-diamine-tétra-acétate de sodium, qui ont tous deux la propriété de transformer la nappe cellulaire continue en une suspension de cellules dispersées.

Par centrifugation à vitesse lente, on recueille les cellules que l'on resuspend dans un nouveau milieu à une concentration de 50 à 150.000 cellules par cc. Le milieu comporte 20 à 33 pour cent d'un pool de sérums humains, complété d'un liquide de Hanks enrichi d'hydrolysate de lactalbumine ou d'extrait de foie total lyophilisé, à l'exclusion d'extrait embryonnaire.

Les cellules adhèrent au verre dès le lendemain et commencent à se diviser. En 3 à 5 jours, la croissance cellulaire est suffisante pour permettre l'utilisation des tubes.

La culture de cellules sanguines

Ford et coll. ont publié une méthode permettant la culture brève de cellules de moelle sternale et la mise en évidence de leurs chromosomes (Ford, Jacobs, Lajtha, 1958; Lajtha, 1959).

Hungerford (1959) recueille les globules blancs, surtout les lymphocytes et monocytes, du sang circulant hépariné, après agglutination des hématies par une phytohémagglutinine.

Lamy et de Grouchy (1961), faisant la synthèse des techniques de Hungerford et Lejeune, ont établi une méthode de mise en évidence des chromosomes des leucocytes du sang circulant qui semble, par la bénignité du prélèvement nécessaire, appelée à un grand succès, du moins pour les recherches génétiques humaines.

IV. — L'ACCUMULATION DES MITOSES

Pour augmenter le rendement des cultures, un premier problème à résoudre est l'accumulation des mitoses.

Il importe en effet d'obtenir le plus grands nombre possible de cellules en prophase tardive ou en métaphase, moments où les chromosomes sont le mieux visibles (cf. p. 27).

Pour obtenir ce résultat, on peut, ou bien bloquer les mitoses en métaphase par la colchicine, ou bien arrêter les mitoses par un artifice quelconque, pour rétablir ensuite des conditions favorables à une activité mitotique accrue par la synchronisation des mitoses.

a) *La Colchicine* a la propriété de bloquer les mitoses en métaphase, d'empêcher la formation du fuseau achromatique et prévient ainsi l'accumulation en amas des chromosomes lors de l'anaphase. Elle a été largement utilisée par de nombreux expérimentateurs et est restée à la base de la technique de Lajtha (loc. cit.) de préparation chromosomiques à partir de cellules de moelle osseuse.

Malheureusement on peut reprocher à la colchicine de nombreux inconvénients et des causes d'erreur : on l'a accusée de changer la morphologie des chromosomes, de les rendre plus trapus ou au contraire plus longs, plus fins ; on l'accuse également de fragiliser les chromosomes, entraînant une séparation précoce du centromère pouvant être à l'origine d'erreur de compte par excès, le même chromosome étant compté deux fois puisque dédoublé avant même la métaphase ; elle pourrait donner une rupture du chromosome lors de la séparation du centromère donnant alors une fragmentation en quatre segments.

Enfin la colchicine est capable d'induire des anomalies cellulaires et Edwards a obtenu des cellules triploïdes et tétraploïdes en traitant par la colchicine les gamètes ou les cellules somatiques de la souris (1958).

Au lieu de chercher à accumuler les cellules en métaphase, il est possible d'arrêter temporairement les divisions cellulaires pendant un temps bref, puis de remettre les cellules en bonnes conditions de développement ; un grand nombre de cellules entreront alors en mitose ensemble, et l'on pourra arrêter la culture au moment où toutes ces mitoses synchronisées et développées dans des conditions naturelles seront en métaphase.

b) Lejeune (1959), pour ses études de chromosomes humains, utilise comme facteur d'arrêt de la croissance cellulaire *l'acidification spontanée du milieu* par les catabolites cellulaires. Au moment choisi, qui est fonction de la pousse cellulaire observée et de l'acidification du milieu traduite par le virage au jaune, ce dernier est neutralisé par quelques gouttes de solution de bicarbonate de soude ou de solution de Hanks, et la culture renourrie avec deux gouttes d'extrait embryonnaire.

La croissance reprend alors et, après un délai de seize heures, les lames sont prêtes pour la préparation histologique.

c) Une troisième façon de synchroniser les mitoses est de les stopper pendant quelque temps par *baisse de la température*.

Chévremont-Comhaire et Chévremont (1956) ont bien montré l'action de température subnormale suivie de réchauffement sur l'activité mitotique. Entre 16° et 20°C, les mitoses commencées s'achèvent, mais aucune autre mitose normale ne se produit plus. En revanche, le métabolisme cellulaire ralenti n'est pas altéré puisque après réchauffement à 37°C se produit une véritable flambée de mitoses. Dans le cas étudié par eux de tissu d'embryon de poulet, le nombre des mitoses, après trois heures de réchauffement, est double de celui des cultures témoins. C'est une technique dérivée de cette dernière que nous avons utilisée.

Arrêtée à ce stade, la culture est prête pour la préparation histologique.

— — — — —

TECHNIQUES GÉNÉRALES D'HISTOLOGIE APPLIQUÉES A L'ÉTUDE DES CHROMOSOMES

Ces techniques permettent la mise en évidence des chromosomes des cellules en prophase tardive ou en métaphase.

De bonnes préparations montrent les chromosomes bien formés, isolés, situés tous dans le même plan, enfin bien contrastés :

- Des chromosomes bien formés : ceci dépend pour une part du stade de la mitose où la culture est arrêtée, que seule l'expérience peut fixer ; ceci dépend aussi de la technique histologique qui ne doit pas introduire d'artefacts.

- Des chromosomes isolés, sans chevauchements ni amas : une bonne dispersion est en effet nécessaire pour pouvoir les compter sans erreur.

- Des chromosomes situés dans le même plan, pour apparaître dans leur vraie longueur, sur la même photographie, sans avoir à modifier la mise au point du microscope.

- Enfin, des chromosomes bien contrastés, et ceci pose un double problème : celui de l'éclaircissement du fond sur lequel se détachent les chromosomes et celui de leur propre coloration.

a) *La dispersion des chromosomes* a longtemps été réalisée par écrasement de la préparation entre lame et lamelle ; ce procédé peut être à l'origine d'altérations traumatiques, étirement ou fragmentation des chromosomes.

Une dispersion moins brutale des chromosomes dans le cytoplasme est rendue possible par la disparition de la membrane nucléaire, sous la condition que le fuseau achromatique soit détruit. Dans ce but, Hsu a proposé, dès 1953, le *choc hypotonique*. Cette technique a été reprise ensuite par Tjio et Levan, Ford et Hamerton en 1956 et est de pratique courante aujourd'hui.

Le contact des cellules avec des solutions nettement hypotoniques entraîne l'altération des structures et le gonflement du cyto-

plasme, facilitant la dispersion chromosomique. La solution hypotonique choisie varie avec les auteurs. Tjio et Puck (1958) recommandent d'utiliser une solution de chlorure de sodium à raison de 1,7 g. pour 1.000 cc. d'eau. Lejeune (1959) utilise une dilution de une partie de sérum sanguin pour cinq parties d'eau distillée et poursuit le choc hypotonique à 37° C pendant 30 minutes environ.

La résistance des cellules à l'hypotonie est variable avec leur type, et les cellules de souche obligent à des chocs plus intenses et plus prolongés que les fibroblastes de première explantation.

b) *La fixation* offre peu matière à discussion.

Tjio et Puck (loc. cit.) utilisent comme fixateur l'aldéhyde formique et l'acide acétique dilués, mais terminent le choc hypotonique par un bain intermédiaire de fixateur très étendu d'eau, précédant la fixation définitive.

Des fixateurs anhydres comme le mélange de Carnoy (alcool absolu, chloroforme, acide acétique) conviennent parfaitement (Lejeune, 1959).

c) *L'étalement des chromosomes sur le même plan.* La technique du « squash », écrasement manuel de la préparation entre lame et lamelle, a longtemps répondu à ce but. Elle offrait l'avantage de parfaire la dispersion des chromosomes lorsqu'à la pression s'ajoutait un léger déplacement latéral.

Cette technique brutale et aveugle a donné de bons résultats entre des mains exercées. Mais il est indéniable qu'elle met sérieusement à l'épreuve la résistance mécanique des chromosomes qui risquent de se rompre et peut entraîner une dispersion de ceux-ci hors des limites de la cellule. Les inconvénients de cette technique, joints à ceux qui résultent de l'emploi de la colchicine, expliquent sans doute la dispersion des chiffres obtenus dans le comptage des chromosomes par les auteurs qui en ont usé, alors que dans les cellules normales ce nombre est remarquablement fixe (Ford, Jacobs, 1958).

Rothfeld et Siminovitch (1958) ont proposé une technique beaucoup moins brutale et aussi efficace, qui consiste à laisser sécher le fixateur sur la lamelle à la fin du bain de fixation. La tension superficielle du film liquidien qui s'évapore est suffisante pour appliquer tous les chromosomes à plat sur la lamelle.

d) *La coloration* est précédée d'une hydrolyse chlorhydrique.

Cette dernière est indispensable lorsqu'on utilise la coloration de Feulgen pour les chromosomes.

Lejeune l'a conservée dans sa technique, car elle fait disparaître toute trace du cytoplasme et permet d'obtenir un bon contraste des chromosomes sur le fond de la préparation. C'est d'ailleurs un temps délicat de la préparation car, trop poussée, elle détache les noyaux de la lamelle, et trop réduite, elle est inefficace.

La coloration proprement dite peut s'effectuer à l'hématoxyline, mais la solution de Bleu de Unna donne d'excellents résultats.

On obtient ainsi des lames que l'on examine après montage au Baume et sur lesquelles il existe un nombre variable de mitoses, dont seules les meilleures, les plus favorables au regard des exigences précisées en tête de ce chapitre, sont utilisables.

Il est possible de compter les chromosomes par l'observation directe à l'objectif à immersion, mais une technique précise oblige à la reproduction photographique.

e) *La photographie des cellules favorables* permet le tirage d'agrandissements.

A partir de l'un de ceux-ci, ou de deux si des croisements de chromosomes existent sur la préparation, ce qui demeure fréquent malgré les précautions, on découpe chaque chromosome.

Les chromosomes sont alors rassemblés par paire dans le cas des cellules normales, ou classés de façon variable dans le cas contraire, en sorte qu'il est possible d'obtenir ainsi une reproduction schématique du caryotype de la cellule étudiée.

LES CHROMOSOMES EN CULTURE DE CELLULES

I. — LA CELLULE NORMALE

Les étapes successives de la mitose seront tout d'abord rappelées; elles comportent, dans un premier temps, la caryocinèse, ou division du noyau.

Au cours de la *prophase*, le réticulum du noyau disparaît et la chromatine se localise en un long cordon pelotonné ou spirème. Ce cordon s'épaissit, se raccourcit et se fragmente transversalement en un certain nombre de chromosomes qui continuent de se condenser. Chacun d'eux se dédouble ensuite longitudinalement, mais les bras ou chromatides restent parallèles et assemblés en un point appelé centromère. Dans le cytoplasme, le centrosome se divise et ses deux fragments gagnent les deux pôles du noyau. Il apparaît entre eux des filaments protoplasmiques qui constituent le fuseau achromatique. A ce moment, la membrane nucléaire disparaît.

Au cours de la *métaphase*, les chromosomes placent leur centromère sur une fibre du fuseau et s'orientent de façon à faire coïncider leur axe de symétrie avec le plan de symétrie du fuseau. Les chromatides réalisent alors la figure dite de la double plaque équatoriale.

L'*anaphase* commence avec le dédoublement des centromères et l'ascension des chromatides vers les pôles.

La *télophase* correspond aux phénomènes inverses de la *prophase*. Elle est suivie de la cytokinèse, ou division du cytoplasme; elle ramène la cellule en *interphase*.

Les *chromosomes* sont en nombre constant pour une espèce animale donnée. Ce nombre, dans toute cellule somatique normale, est pair ($2n$ =diploïdie). La méiose donne naissance à des gamètes dont le nombre chromosomique est simple (n =haploïdie). Le nombre chromosomique d'une cellule particulière peut atteindre des chiffres anormaux, multiples entiers en général du nombre normal: $4n$ =tétraploïdie; $8n$ =octoploïdie... Toutes ces cellules sont dites euploïdes. Anormalement, on peut rencontrer dans les cellules un nombre chromosomique de $3n$ =triploïdie. Enfin, le nombre chro-

mosomique s'écarte parfois du chiffre normal et la cellule est dite aneuploïde; selon l'importance de l'écart, l'aneuploïdie est légère ou extrême.

Les chromosomes sont constitués essentiellement de molécules d'*acide désoxyribonucléique* (ADN), entourées de protamines et d'histones. Par des techniques microphotométriques sur les noyaux colorés au Feulgen, ou par la méthode autoradiographique par incorporation de thymidine marquée, il a été possible d'étudier le métabolisme de l'ADN (Lajtha, 1955). Ainsi, la synthèse de l'ADN prendrait place au cours de l'interphase, précédée et suivie d'une période de repos métabolique qui encadre la mitose.

Le *schéma de Watson et Crick* (1953) a le mérite de montrer clairement le phénomène de la duplication de la chaîne de nucléotides. La molécule d'ADN se présente schématiquement comme une échelle tordue en spirale autour de son grand axe. Aux barreaux correspondent les liaisons chimiques entre les bases (thymine, cytosine, adénine, guanine) et les montants sont représentés par la chaîne des liaisons cycliques phosphate-pentose-phosphate, etc. (fig. 1). Pour des raisons qui tiennent à la configuration stéréochimique de la molécule, l'accouplement des bases ne peut se faire qu'entre adénine et thymine ou entre guanine et cytosine. Lorsque la molécule se divise, c'est longitudinalement, au niveau des liaisons entre les bases. En sorte que, pour les raisons stéréochimiques déjà invoquées, chaque moitié ne peut reconstituer qu'une chaîne identique à celle dont elle a été séparée. S'il est tentant en raison de cette autoreproductibilité de la molécule d'ADN et de nombreuses expériences de Levinthal (1956) de faire de l'ADN le support ultime de l'hérédité, il faut néanmoins signaler que Mazia (1955) et Plaut (1957) ont montré que la répartition de l'ADN formé était inégale entre les cellules filles au cours de la mitose.

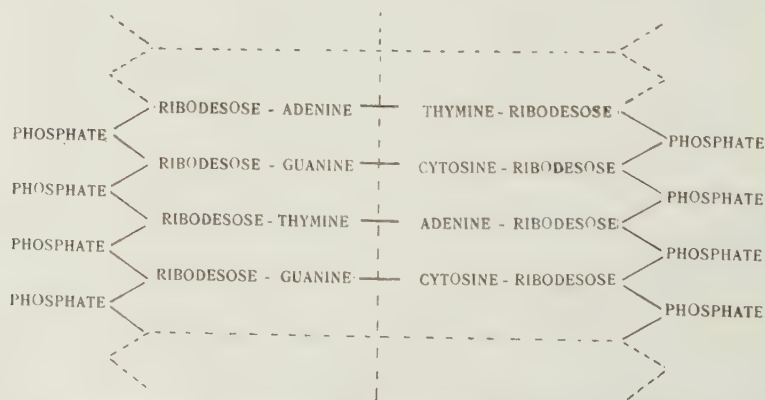


Fig. 1. — Schéma d'un fragment de la molécule d'acide désoxyribo-nucléique (selon Watson et Crick, 1953)

II. — LE CARYOTYPE HUMAIN NORMAL

Les travaux de tous les auteurs, sauf Kodani (1958), depuis ceux de Tjio et Levan en 1956, ont confirmé le nombre diploïde normal chez l'homme de 46 chromosomes.

Les techniques précédemment exposées ont permis, par montage photographique, de dessiner un aspect schématique du caryotype des cellules humaines normales.

Ce caryotype comprend 22 paires de chromosomes autosomes numérotés de 1 à 22 par ordre de taille décroissante, et 2 chromosomes sexuels. On a ainsi (fig. 2) :

a) *Groupe 1 à 3* : ce sont de grands chromosomes à centromère quasi-médian. On les distingue entre eux par leur dimension et la position non identique du centromère.

b) *Groupe 4 et 5* : ce sont de grands chromosomes à centromère sub-médian.

c) *Groupe 6 à 12* : ce sont des chromosomes de dimension moyenne, avec centromère médian ou sub-médian. Au sein de ce groupe, les identifications sont difficiles.

d) *Groupe 13 à 15* : ce sont des chromosomes de taille moyenne mais à centromère quasi-distal (grands acrocentriques ou télocentriques de la classification Lejeune). Les quatre chromosomes 13 et 14 possèdent chacun des masses hétéro-chromatiques sur leurs petits bras, qui permettent de les identifier.

e) *Groupe 16 à 18* : ce sont de petits chromosomes à centromère médian (16) ou sub-médian (17 et 18).

f) *Groupe 19 et 20* : ce sont de petits chromosomes à centromère médian, en croix de Saint-André (Lejeune).

g) *Groupe 21 et 22* : ce sont de très petits acrocentriques en forme de V. Les deux chromosomes 21 possèdent des masses hétérochromatiques satellites sur leurs petits bras.

h) Le chromosome X a la taille d'un chromosome de la 6^e paire avec un centromère sub-médian. Le chromosome Y ressemble à un chromosome 22, mais est un peu plus trapu.

Pour classer plus aisément les chromosomes, on a établi des mesures paramétriques. On en définit trois pour chaque chromosome :

1) la longueur relative de chaque chromosome exprimée en millièmes par rapport à la longueur totale du caryotype haploïde (22 autosomes + X).

2) le rapport grand bras/petit bras.

3) l'index centromérique, ou rapport: petit bras/longueur totale du chromosome.

Bien que ces mesures varient un peu selon les auteurs et surtout selon le stade de la mitose considéré, dans l'ensemble ces données standard sont concordantes (Groupe d'étude de Denver, 1960).



Fig. 2

CARYOTYPE HUMAIN CLASSIFICATION INTERNATIONALE de Denver

Les chiffres latéraux indiquent la longueur de chaque chromosome en millième du caryotype haploïde normal, et la proportion du petit bras à la longueur du chromosome.

III. ANOMALIES CONSTATÉES SUR LES EXPLANTS PRIMAIRES DE TISSU SAIN

Les anomalies observées dans les cultures d'explants primaires de tissu non cancéreux sont des anomalies de forme et des anomalies de nombre.

Parmi les *anomalies de la morphologie*, ne peuvent être comprises les modifications d'aspect qui caractérisent le déroulement de la mitose (chromosomes courts, trapus, hypercondensés ou au contraire étirés, étroits, allongés (leptochromosomes) et qui atteignent au même degré tous les chromosomes d'une même cellule. Seules sont envisagées ici les anomalies qui atteignent un petit nombre de chromosomes ou un seul d'entre eux. De ces observations encore rares et non systématisables, seront citées seulement : dans certaines oligoménorrhées sévères, le raccourcissement isolé d'un chromosome X (De Grouchy, 1961); dans certains syndromes mongoliens avec nombre chromosomique normal, un chromosome 15 inapparié car plus grand que son semblable et résultant probablement d'une fusion avec le chromosome 21 surnuméraire habituellement constaté dans ces états (EK, 1961).

La *polyploïdie* existe dans les tissus sains et les cultures de première explantation. Helweg-Larsen, Leuchtenberger, enfin Alfert, par mesure micro-spectrophotométrique de la charge des noyaux en acide désoxyribonucléique (A.D.N.), avaient constaté l'existence dans le foie de souris et de rats, de cellules 2, 4 et même 8 fois plus riches que les cellules normales. Le taux de ces noyaux anormalement riches augmente considérablement avec la croissance et l'âge du rat; il s'élève aussi beaucoup après hépatectomie partielle, dans le lobe restant, en état de régénération active. Ces noyaux sont absents du foie des souris naines hypophysaires, mais apparaissent après injections de somathormone.

Le rôle de cette hormone dans l'apparition de ces cellules n'est pourtant pas admis par tous les auteurs (Swartz, 1960). Ce phénomène n'est pas particulier aux rongeurs et Swartz (1956) l'a retrouvé dans le foie humain.

Mortreuil-Langlois a d'ailleurs pu montrer sur des étalements de cellules de foie de souris en état de régénération et en l'absence de colchicine, facteur de polyploïdie, que cette charge anormale en ADN correspondait bien à une polyploïdie et pas seulement à une polyténie (taille anormale des chromosomes).

De plus, cette tétraploïdie stricte existe dans les cultures de première explantation de fibroblastes humains, et on la retrouve

dans environ 5 pour cent des mitoses. Elle n'est pas un obstacle à l'examen du caryotype, car il suffit d'assembler les chromosomes identiques par quatre pour retrouver au complet les différents types attendus.

La *triploïdie* est une anomalie exceptionnelle. Elle a été retrouvée chez deux fœtus morts in utero et chez un homme malformé; elle était isolée chez un des fœtus (Delhanty) et associée à des cellules normales dans les autres cas (Penrose L.J.; Book, 1960). C'est seulement dans ce dernier cas (mosaïque) qu'elle semble compatible avec la vie.

L'*aneuploïdie*, qui est observée dans les cellules saines de première explantation, s'écarte peu du chiffre normal.

Lorsque l'aneuploïdie résulte d'une anomalie de la division des gamètes, elle touche toutes les cellules de l'individu, s'inscrit dans le patrimoine héréditaire et détermine habituellement des malformations grossières ou des anomalies sexuelles qu'il n'est pas de notre propos de détailler ici.

L'aneuploïdie s'observe aussi dans un petit nombre de cellules cultivées à partir d'explants primaires de sujets normaux. Longtemps cette aneuploïdie a été tenue pour un pur artefact. Récemment, P. A. Jacobs a pu montrer que cette aneuploïdie augmente de fréquence avec l'âge du sujet donneur de l'explant, que ce sujet soit normal ou mongolien. En sorte qu'à côté d'anomalies provenant d'artefacts techniques, un certain nombre de ces cellules aneuploïdes au sein de tissus normaux proviennent de mitoses anormales dont la fréquence augmente avec l'âge. Cette proportion ne serait d'ailleurs pas plus élevée dans le tissu sain des sujets cancéreux que dans celui des sujets normaux. Toutefois, ces faits d'importance théorique considérable méritent confirmation.

IV. LES MITOSES DANS LES TISSUS ET LES EXPLANTS PRIMAIRES DE TISSU CANCÉREUX

Les études générales concernant les mitoses des cellules cancéreuses sont nombreuses et déjà anciennes.

Koller, en 1947, faisait remarquer que s'il existait des *anomalies flagrantes de la mitose des tissus cancéreux*, le déroulement

de bien des divisions cellulaires y était normal. Il signalait que le pourcentage des mitoses atypiques était variable à l'intérieur d'une même tumeur selon le fragment examiné, s'élevait à 30 pour cent dans les zones centrales mal vascularisées et seulement à 5 pour cent dans les zones périphériques ou péri-vasculaires. Les anomalies observées concernent l'existence de mitoses à fuseau unipolaire ou plus souvent multipolaire, de cellules multinuclées dont tous les noyaux entrent en division ensemble. Le nombre des chromosomes, difficile à préciser, permet de distinguer, en dehors de cellules d'apparence normale, des cellules hautement polyploïdes, à petits chromosomes très nombreux, punctiformes, et des cellules de nombre chromosomique nettement déficitaire (24 ou 32) bien individualisé sur certaines préparations.

En ce qui concerne les *anomalies morphologiques*, il est signalé des chromosomes visqueux (sticky), de calibre irrégulier, étirés entre les deux masses de chromosomes en anaphase et les unissant par de nombreux filets. Les chromosomes « en pont », étirés, amincis, simples ou doubles, mais peu nombreux, existent entre ces deux mêmes masses et sont encore présents à la télophase ou lors de la cytokinèse. Enfin, des chromosomes de morphologie normale sont parfois en retard sur les autres dans leur déplacement anaphasique. Cependant, en raison de la technique du squash (écrasement manuel) employé par Koller dans ses travaux, certaines anomalies peuvent n'être que des artéfacts, en particulier les chromosomes « visqueux ».

Koller, reprenant ses observations en 1956 sur des cellules d'ascites humaines malignes, insistait : sur l'existence de chromosomes en pont entre les masses en anaphase ; sur l'existence de chromosomes acentriques situés hors du fuseau achromatique ; sur la super-fragmentation des chromosomes observés dans les cellules hautement polyploïdes, super-fragmentation qui va parfois jusqu'à une véritable désintégration chromosomique qui représente sans doute une façon de mourir de la cellule cancéreuse. Suivant la nature du cancer, cause de l'ascite, il opposait deux types de cellules : les unes libres, surtout diploïdes ou presque diploïdes, observées au cours des cancers anaplasiques ; les autres en placards, le plus souvent de nombre chromosomique presque tétraploïde, particulièrement sensibles à l'or radio-actif, et qu'on observerait surtout dans les cancers différenciés.

En 1954, Hsu, étudiant sur des explants primaires cinq tumeurs humaines et trois liquides d'ascite, signalait que les chromosomes paraissaient fragmentés dans certains cancers. Mais les chromosomes d'une tumeur de la granulosa, d'un cystadénocarcinome et

d'un mélanome métastatique avaient une apparence normale. Le décompte donnait pour le liposarcome deux types de cellules, les unes à 70 et les autres à 140 chromosomes, sans cellules normales ou tétraploïdes, et pour le mélanome, une seule variété de cellules comprise entre 45 et 50 chromosomes, plus quelques cellules presque tétraploïdes. Pour apprécier la valeur de ces résultats, il faut se souvenir qu'alors la technique n'avait pas encore permis de découvrir le nombre exact des chromosomes humains.

Hansen-Melander, en 1956, examinant les cellules d'une ascite de cystosarcome de l'ovaire, signalait deux types de cellules à 58 et à 63 chromosomes.

Makino, en 1959, a publié les résultats de trente examens de tumeurs humaines par la technique du squash de coupes fines de biopsies ou de cellules d'épanchement des séreuses. Il a rencontré de nombreuses anomalies du caryotype de ces cellules et, en dépit de la dispersion des chromosomes inhérente au « squash », décrit cinq tumeurs diploïdes ou presque diploïdes. Il s'agit d'un carcinome de l'ovaire, d'un réticulo-sarcome, d'une métastase pleurale de cancer bronchique, d'un liquide d'ascite de cancer gastrique et d'une biopsie de col utérin. Les caryotypes ne sont analysés qu'en fonction de la situation du centromère (médian, submédian ou terminal) mais les résultats montrent que ces caryotypes sont identiques ou très voisins de celui d'une cellule normale.

Stolte a pu montrer qu'il existait sur des squash de tissus frais de môle hydatiforme des cellules normales et des cellules curieusement hypo-diploïdes. Galton a pu compter dans un tératome de l'ovaire un nombre normal de chromosomes.

Ainsi se confirmait, avec le caractère mosaïque des tissus cancéreux, le fait que certaines cellules y avaient non seulement une morphologie subnormale, mais un nombre de chromosomes normal. Si l'aneuploïde y est fréquente, la polyploïde y semble d'une fréquence à peine supérieure à celle des tissus normaux.

Récemment, Bayreuther a publié les résultats de décomptes de chromosomes dans des tumeurs primaires spontanées de chat et dans des leucémies humaines de divers types, où le nombre chromosomique s'est révélé toujours normal. Dans les tumeurs spontanées de la souris et dans les tumeurs virales du rat et de la souris, il s'est révélé rarement anormal, mais cela surtout dans des tumeurs transmises par greffe. Dans les tumeurs du rat, de la souris et du hamster, déterminées par des moyens chimiques, le nombre chromosomique s'est révélé normal une fois sur deux. Dans cette étude où les prélèvements ont été faits, du moins en

ce qui concerne les tumeurs expérimentales, aux tout premiers stades de développement, les cellules de nombre chromosomique normal prédominent largement dans le tissu cancéreux. Lorsqu' existent des cellules de caryotype anormal, elles sont groupées le plus souvent dans une même région de la tumeur. Jamais, cependant, le caryotype n'a été considéré au point de vue de sa morphologie, mais seulement au regard du nombre chromosomique.

Il semble donc que les tissus cancéreux comportent un pourcentage assez élevé de cellules aneuploïdes, mais il ne semble pas s'agir là d'un phénomène constant ni même primitif.

Dans l'analyse de cette apparition de l'aneuploïdie des cellules malignes, l'observation des cellules de souche, cancéreuses mais surtout normales, est très instructive.

V. — LES CELLULES DE SOUCHE HUMAINE, CANCÉREUSE OU NON, ET LEURS ANOMALIES CHROMOSOMIQUES

1^o) **Origine et évolution des cellules de souche** au cours de repiquages successifs.

Le repiquage itératif d'explants en subculture devait permettre d'obtenir des cellules dites de souche, facilement entretenues ensuite par le moyen de la trypsination. Il n'y a rien d'étonnant dans le fait que les souches issues d'explants de cancers présentent les caractères cytologiques habituellement considérés comme l'apanage de la malignité (variations de taille et d'aspect des noyaux, variations du rapport nucléo-plasmatique, fréquence des cellules multinuclées géantes).

Mais l'évolution de la plupart des souches issues d'explants de tissus sains réserve d'autres surprises. Qu'il s'agisse des souches de cellules humaines normales de conjonctive, de foie, ou d'intestin de Chang (Chang, 1954; Moore, Southam, 1956) ou d'autres cellules normales (Jordan, 1956; Berman, Stulberg, 1956; Leslie, Fulton, 1956; Leighton, Kline, 1956; Moore, 1957; Swim et Parker, 1958), les modifications d'aspect qu'on observe sont identiques d'une souche à l'autre. Les cellules issues de l'explant primaire, repiquées par îlots transférés à l'aide d'une anse de platine, sont d'abord d'aspect fibroblastique et forment des palissades ou des réseaux de cellules fusiformes; leur croissance est lente, leur nombre chromosomique semble normal. Après plusieurs repiquages apparaissent brutalement des cellules d'aspect épithélial qui finissent par supplanter les précédentes: elles forment des colonies à bords nets, francs, dont les cellules polygonales jointives ont l'aspect d'un épithélium pavimenteux; leur croissance est rapide, leur nombre chromosomique semble nettement augmenté. Il n'y a jamais retour vers le type primitif.

Toutes ces souches issues de cellules normales présentent après quelques mois un aspect à peu près identique, voisin de celui pris dès le début par des souches directement issues de cancers. Ces modifications ne sont pas seulement morphologiques, et Vernon Riley (in Moore, 1957) a montré que la glycolyse anaérobie des cellules de souche saine se situait entre celle des cellules

normales qui est basse et celle des cellules cancéreuses qui est élevée.

Hauschka (1952 et 1953) a montré que ces cellules polyploïdes survivent et se développent plus facilement que les diploïdes sur certains hôtes hétérologues, et cette transplantabilité passe à ses yeux pour un caractère spécifique de la malignité.

Tous ces caractères semi-cancéreux sont acquis en culture par transformation successive du caryotype normal. Il est d'ailleurs à remarquer que, même lorsque la souche est initialement cancéreuse, ses cellules proviennent, génétiquement parlant, de modifications de cellules normales.

2°) Modifications acquises du caryotype

Elles ont été particulièrement étudiées par Levan et Hauschka (1953), puis Hsu et Moorhead (1956), par microcinématographie en contraste de phase, des cellules Hela (souche humaine issue d'un épithélioma du col utérin).

Ces modifications résultent de deux types de phénomènes opposés et successifs: la *polyploïdisation* qui élève le nombre chromosomique; l'*aneuploïdisation* qui le réduit.

A — La *polyploïdisation* peut résulter de plusieurs mécanismes.

a) L'*endomitose* a été décrite pour la première fois par Geitler en 1937, retrouvée par Biesele et Poyner dans des tumeurs cancéreuses de la souris, par Stilwell (1952) sur les cellules de cœur embryonnaire de poulet, enfin par Levan et Hauschka dans les cellules d'ascite maligne de la souris, en 1953.

« L'*endomitose vraie* » débute comme une mitose, avec spiralisation de la chromatine et constitution des chromosomes, mais sans disparition de la membrane nucléaire. Les chromosomes se dédoublent à l'intérieur de cette membrane, puis, sans division cellulaire, se dés spiralisent. Le noyau comporte alors un nombre de chromosomes doublé. Ce phénomène semble rare.

b) Levan appelle *endoreduplication* ou « endomitose cachée », les doubléments du nombre chromosomique qui surviennent pen-

dant l'interphase à l'intérieur d'un noyau en apparence quiescent. C'est seulement au cours de la mitose suivante que se verront d'emblée les diplochromosomes, appariés par deux, autour du même centromère. L'ascension anaphasique donnera des cellules filles à quatre chromosomes d'emblée. Parfois, des doubléments successifs dans l'interphase donnent des cellules tétra ou octoploïde à $4n$ ou $8n$ chromosomes.

En réalité, les phénomènes sont plus complexes et il semble qu'on puisse décrire cinq types de « duplication » chromosomique que l'on distingue par la phase au cours de laquelle ils surviennent :

1) *L'inter-duplication* survient en interphase : ce n'est pas autre chose que l'endoreduplication de Levan.

2) *La pro-duplication* survient en prophase : c'est l'endomitose vraie.

3) *La méta-duplication* survient au cours de la métaphase et est analogue au phénomène réalisé par la colchicine : blocage de la métaphase par absence de fuseau achromatique. Dans ces conditions, après un certain temps, la membrane nucléaire se reforme autour d'une masse de chromosomes dédoublés.

4) *L'ana-duplication* a été mise en évidence une seule fois dans un film de Levan : c'est le retour en arrière des chromosomes ayant commencé leur mouvement anaphasique et leur confluence en un seul noyau.

5) *La télo-duplication* est la fusion des cellules filles pendant ou même après la fin de la cytokinèse. Elle aboutit à la formation de cellules multinucléées, c'est-à-dire au même résultat que l'absence de cytokinèse.

Tous ces mécanismes, quel que soit leur déroulement intime, mènent à des cellules polyploïdes comportant un nombre de chromosomes multiple entier du nombre de base.

La cellule Hep² (Human epidermoid carcinoma 2 : issue d'une métastase de cancer du larynx de l'homme) de la fig. n° 3 est un exemple d'endo-reduplication. Cette cellule, fixée au cours de la métaphase et heureusement peu dispersée, montre ses chromosomes encore appariés mais incomptables en raison des superpositions.

B — *L'aneuploïdisation* résulte de mécanismes très anormaux et peu systématisables.

a) *La non-disjonction chromosomique* (Hsu, 1953) est un premier facteur d'aneuploïdie mais, pour en fournir la preuve cytologique, il faut une grande asymétrie de la distribution des chromosomes. L'existence confirmée de chromosomes en retard dans leur mouvement anaphasique ou même de chromosomes situés hors de la plaque équatoriale à la métaphase explique la dyssymétrie de la distribution. Il serait théoriquement facile d'en administrer la preuve en établissant le caryotype des cellules filles, mais ceci supposerait une lignée cellulaire de caryotype fixe où précisément le phénomène recherché serait très rare. Par ailleurs, Hsu et Moorhead ont observé une dés spiralisation des chromosomes pendant l'anaphase, donnant alors trois noyaux à la télophase : cette distribution anormale grossière est indiscutable.

b) L'existence de *mitoses multipolaires*, où la distribution chromosomique est loin d'être régulière entre les noyaux fils, est un second facteur d'aneuploïdie. Hsu et Moorhead, sur 39 cellules au fuseau mal formé, en ont vu mourir 18, se recondenser 1, et 20 seulement mener leur mitose anormale jusqu'à son terme. C'est dire que ce phénomène fréquent et d'existence indiscutable est loin de donner toujours naissance à des cellules viables et douées de la fonction de reproduction.

3°) **Anomalies chromosomiques des cellules de souche cancéreuse.**

a) *L'aspect des chromosomes :*

Avec l'amélioration des techniques d'étude, les anomalies morphologiques grossières sont devenues exceptionnelles. En revanche, des anomalies mineures sont rarement signalées. Il peut s'agir de chromosomes en anneau, d'inégalité flagrante des chromatides ou de chromosomes dicentriques comme en avait vu Chu dans la souche HeLa, clone S₃/RA₁ (1958).

b) *Le nombre de chromosomes*

Les observations concernant le nombre chromosomique des cellules de souche cancéreuse sont actuellement nombreuses.

En ce qui concerne la souche *Hela*, Hsu avait compté en 1954 un nombre de chromosomes le plus souvent compris entre 90 et 100; il signalait déjà l'extrême hétérogénéité de la souche quant au nombre chromosomique et l'instabilité de celui-ci au cours des générations successives. Le même auteur, en 1957, sur 50 cellules d'un clone (lignée cellulaire issue de la culture d'une seule cellule) de cellules *Hela*, désigné sous la sigle S_3 , trouvait des nombres chromosomiques variés qui se situaient pour 20 cellules dans la classe 81-85, pour 16 cellules dans la classe 76-80. En 1957 également, Tjio et Puck ont compté pour les clones S_1 et S_3 des cellules *Hela*, 60 pour cent de cellules ayant 78 chromosomes, et pour le clone $S_3/9$ (issu d'une cellule du clone S_3) 90 pour cent de cellules à 73 chromosomes. Dans les limites d'une observation brève de quelques générations, ces clones sont au regard de leur nombre chromosomique d'une stabilité relative.

Mais il est remarquable de constater que, depuis l'isolement de la souche *Hela*, son *nombre chromosomique moyen tend à diminuer* au cours des repiquages successifs et il en est de même des nombres chromosomiques pourtant moins variables des clones qui en ont été successivement tirés.

Ce phénomène est d'ailleurs général en culture de cellules, et Levan notait déjà en 1956 que les cellules de la souche Ehrlich (ascite cancéreuse transmissible de la souris) étaient passées de 82 chromosomes à la 20^e génération à 75 chromosomes à la 190^e. La souche Krebs était passée de 78 chromosomes à la 1^{ère} génération, à 80 à la 50^e, puis 73 à la 205^e génération.

En ce qui concerne la souche *Hep*², les publications sont moins nombreuses. Pour Levan, en 1956, le nombre chromosomique de la même souche *Hep*², très variable, était de 74 à 80 pour les cellules cultivées in vitro et seulement de 50 à 56 pour les mêmes cellules provenant de biopsie de greffes réalisées sur le hamster. Cette différence ne peut résulter que de l'*influence du milieu* dans lequel les cellules vivent, peut-être d'ailleurs par l'effet d'une véritable sélection naturelle des plus résistantes.

c) *Les tentatives d'étude de caryotype*

Chu, en 1958, introduisait dans l'étude des chromosomes, à côté de leur nombre, la notion de leur forme. Il confirmait que les

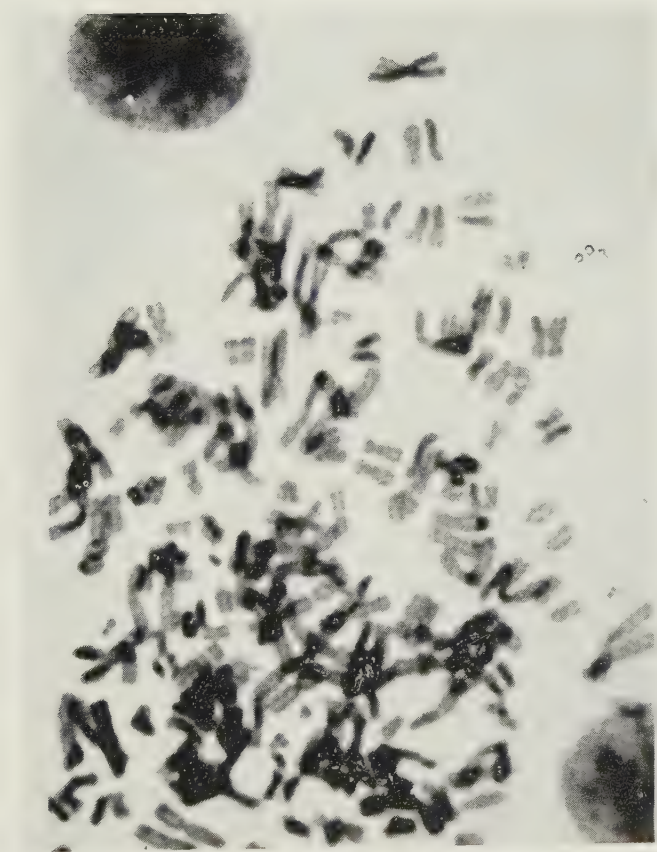


Fig. 3. — *Endoreduplication de Levan*

Cellule aneuploïde Hep2 fixée en cours de métaphase. La dispersion des chromosomes étant assez peu marquée, leur décompte exact est impossible mais les paires de chromosomes formées dès la prophase restent assemblées.

En haut, image d'un noyau normal en interphase.

clones S₁ et S₃ de cellules Hela avaient 78 chromosomes mais, classant ces chromosomes d'après la position de leur centromère, sans tenir compte de leur taille, distinguait deux caryotypes d'après les aspects des chromosomes (M à centromère médian ou submédian, S à centromère subterminal ou distal, T à centromère terminal). La souche S₁ comportait 30 chromosomes M, 46 chromosomes S, 2 chromosomes T. La souche S₃ comportait 31 chromosomes M, 43 chromosomes S et 4 chromosomes T. Il ajoutait que les deux chromosomes télocentriques du clone S₁ étaient de petite taille alors que les quatre chromosomes correspondants de la souche S₃ étaient de taille moyenne.

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature de données précises sur les caryotypes des cellules Hep².

VI. — TENTATIVE D'INTERPRÉTATION DES ANOMALIES OBSERVÉES

Pour expliquer l'apparition de l'aneuploïdie, diverses hypothèses ont été formulées.

Les phénomènes conduisant à l'aneuploïdie, témoins de la dégénérescence, seraient, selon certains expérimentateurs (Goldblatt, 1953), induits par l'anaérobiose relative. Cette théorie séduisante concorde d'ailleurs avec la remarque faite dès 1947 par Koller (déjà cité) que les mitoses anormales existaient surtout dans les zones tumorales mal vascularisées, voisines des zones de nécrose. Elle explique la dégénérescence des cultures en explants repiqués en caillot de fibrine ou sous éponge de cellulose, et pour cette raison mal oxygénés. En revanche, on a pu obtenir des lignées cellulaires issues de cellules normales et restant euploïdes après un grand nombre de repiquages, par des techniques précises: la culture de cellules de peau trypsinée d'emblée doit se faire sans caillot plasmatique (Morton, 1951), sans extrait embryonnaire et dans des conditions de milieu, de pH, de température et d'oxygénation bien déterminés et strictement respectés (Puck et Ciecura, 1958).

Ainsi, des conditions de culture particulières permettent de maintenir des cellules de tissu sain à leur nombre normal de chromosomes et les altérations de la mitose observées dans le cas général des explants repiqués (qui sont à l'origine de la plupart des souches connues) sont, pour une part importante, liées aux conditions de vie extérieures à la cellule.

D'ailleurs, le fait que le nombre chromosomique soit souvent normal dans les cellules cancéreuses d'explants primaires, plaide en faveur du caractère secondaire de l'aneuploïdie. L'accumulation des cellules aneuploïdes serait alors le fait d'une véritable sélection vitale, ces cellules étant mieux adaptées à l'anaérobiose et d'avantage capables de transplantation et de métastase (Rabotti, G.).

Si l'aneuploïdie n'est pas toujours un caractère primitif de la cellule cancéreuse, peut-être faut-il rechercher l'origine du trouble dans une anomalie qualitative des chromosomes.

Déjà il avait été signalé que le caryotype des cellules du sarcome du rat (Yoshida, 1952) montrait un chromosome en V qui n'existait pas dans le caryotype des cellules normales et qu'on ne pouvait confondre avec aucun autre.

Récemment (1960), Nowell et Hungerford, puis Baikie et Court Brown ont montré l'existence dans les cellules sanguines des leucémies myéloïdes chroniques humaines d'une anomalie chromosomique particulière: l'un des chromosomes de la paire 21 est de taille notablement réduite.

Il est trop tôt pour savoir si cette découverte est la première d'une série fructueuse ou si elle restera isolée. Il est possible que nos moyens actuels, pour précis qu'ils soient, restent insuffisants pour mettre en évidence le trouble génétique initial qui libère la cellule des mécanismes régulateurs de la croissance, en particulier si ce trouble se produit à l'échelle encore inaccessible des gènes.

TRAVAUX
PERSONNELS

I. — TECHNIQUE DE CULTURE DES CELLULES

Il s'agit de cultures de cellules de souche, dans des conditions identiques pour les deux lignées cellulaires utilisées, Hela et Hep2. Ces cellules poussent dans les conditions définies ci-dessous en nappe continue à la surface du verre des récipients de culture et doivent être repiquées périodiquement dans des conditions d'asepsie bactériologique parfaite.

A — Milieu de culture choisi

Le milieu utilisé est un mélange comprenant 70 pour cent de solution nutritive et 30 pour cent de sérum humain.

a) La *solution nutritive* est constituée par la solution classique de Hanks (voir p. 7), réalisée avec une eau distillée secondairement passée sur résines, qui donne satisfaction bien qu'elle renferme encore à l'analyse spectrographique de multiples ions métalliques comme cela a été vérifié au laboratoire de Pathologie expérimentale (Dr J. Paupe).

A un litre de cette solution est ajouté 5 gr. d'un hydrolysate de protéine de foie (Héparino Evans) qui apporte des acides aminés et des vitamines indispensables. Le pH de la solution est ramené à 7,5 environ par 4 à 5 cc. de solution normale de soude.

La solution est alors stérilisée par filtration, sous pression de 500 gr./cm² d'air chargé de 4 % de gaz carbonique, à travers un filtre Seitz de porosité EKS II, puis mélangée au moment de l'emploi au sérum utilisé.

b) Le *sérum humain* provient d'un pool composé des excédents des sérums examinés au laboratoire du pavillon Brocq à l'hôpital Saint-Louis. Il comporte donc un mélange de sérums syphilitiques, de sérums normaux, collectés chaque semaine, et conservés à +4°.

Chaque pool est filtré deux fois : d'abord par aspiration à travers une membrane clarifiante Seitz de porosité 0 ou 2, pour éliminer les impuretés grossières et les cellules ; puis sous pression dans un filtre stérilisé à travers une membrane stérilisante Seitz EKS II. Le pool est alors stocké à $+ 4^{\circ}$ et utilisé rapidement ou conservé congelé à $- 20^{\circ}$. Chaque pool est testé avant emploi pour s'assurer de sa stérilité et de sa capacité d'assurer la pousse cellulaire. La conservation prolongée à $- 20^{\circ}$ est souvent nocive, peut provoquer l'apparition de floculats à la décongélation et rend le sérum impropre à la culture des cellules, presque constamment après deux à trois mois.

Nous avons cessé rapidement de nous servir d'antibiotiques dans le milieu ainsi préparé, car les risques d'infection sont rares en culture de cellules de souche avec les précautions d'asepsie bactériologique habituelles.

B — *Récipients utilisés pour la culture des cellules*

Pour l'entretien des souches sont utilisés des flacons à faces plates, du type dit « mexicain », de 125 cc. de contenance.

Pour tester les sérums, sont employés des tubes pyrex ronds de 170×17 mm. à travers la paroi desquels il est facile de suivre l'évolution de la culture *in vivo* avec un objectif à faible grossissement.

Pour toutes les préparations histologiques, nous utilisons les tubes dits de Barski, possédant à leur extrémité un méplat permettant de loger une lamelle microscopique de 12×32 mm. sur laquelle se développera la culture.

Toute la verrerie est lavée, en dépit des avis contraires, avec les produits détergents du commerce, mais abondamment rincée trois fois à l'eau de ville et deux fois à l'eau distillée.

La verrerie est stérilisée au four Poupinel, les récipients étant bouchés provisoirement avec une capsule de feuille d'aluminium.

Le bouchage des récipients s'effectue lors de leur utilisation :

— avec des bouchons de bakélite à fond de caoutchouc blanc pour les flacons mexicains ;

— avec des bouchons de polyéthylène pour les tubes ronds ou à lamelle.

Le lavage des bouchons s'effectue de la même façon que celui de la verrerie, mais ils sont longuement bouillis avant le premier usage. Leur stérilisation est réalisée à l'autoclave.

C — *Entretien des souches*

On choisit un flacon de culture donnant toute satisfaction du point de vue de la pousse cellulaire (culture en nappe continue, cellules polyédriques régulières; absence de cellules rondes ou granuleuses et à fortiori de desquamation cellulaire dans le milieu de culture, qui signent le vieillissement).

Ce flacon est vidé de son milieu, les cellules restent adhérentes au verre; on introduit 15 ou 20 cc. d'une solution de Trypsine à 0,25 ou 0,50 pour cent dans la solution de Hanks.

À 37°, en quelques minutes, la membrane formée par les cellules se détache du verre. On la fragmente d'abord par agitation du flacon à la main, puis par aspiration-refoulement rapide et répété huit à douze fois dans une pipette stérile. De cette manière, on obtient une suspension homogène de cellules libres ou d'agglomérats de quelques cellules.

Cette suspension est alors centrifugée dans un tube stérile bouché à la vitesse de 800 tours minute pendant cinq minutes. Il se forme un culot adhérent et cohérent et l'on peut ainsi éliminer la solution de trypsine surnageante.

Le culot est alors repris dans 5 ou 10 cc. de milieu et remis en suspension par agitation et aspiration-refoulement à la pipette.

Une goutte est prélevée et la densité de la suspension est mesurée à la cellule de Nageotte. Cette donnée permet de réaliser par dilution une concentration optimum définitive de 50.000 à 150.000 cellules par cc. pour l'ensemencement des nouveaux flacons. Avec quelque habitude, on apprécie relativement bien à l'œil la densité de la suspension pour les repiquages simples ne nécessitant pas de grande précision.

On ensemente à chaque fois au moins deux flacons pour se garantir d'éventuelles contaminations, rares en fait, ou d'accidents de pousse, plus fréquents.

Les flacons sont alors étiquetés et conservés immobiles, à plat, en étuve, pour la moitié d'entre eux à 37°, pour l'autre moitié à 34°, afin d'obtenir par des vitesses de pousse différentes des flacons disponibles pour le repiquage des tubes en des délais variables (Gey, Hanks, 1948).

Le lendemain, les cellules ont adhéré au verre et les premières mitoses apparaissent. La culture se poursuit alors sous surveillance. Le milieu doit être remplacé lorsqu'il vire au jaune orangé.

Le repiquage suivant sera fait lorsque la nappe unicellulaire aura recouvert la presque totalité de la surface de verre mise à sa disposition, c'est-à-dire à intervalle d'environ 6 à 8 jours selon la densité de l'inoculat initial et la qualité de la pousse obtenue.

D — *Ensemencement et culture dans les tubes à lamelle*

Il se fait de la même façon que le repiquage des flacons, et souvent à l'occasion de celui-ci.

La suspension cellulaire utilisée est répartie à la pipette à raison de 2 cc. par tube.

Les tubes, bouchés et étiquetés, sont alors groupés dans de petits portoirs inclinés d'environ 5° sur l'horizontale, lamelle en bas, et portés à l'étuve à 37° C.

Le lendemain, les cellules adhèrent au verre et on peut, grâce à leur réfringence, suivre leur croissance en retournant le tube, lamelle en haut, sous l'objectif à faible grossissement du microscope.

Les cellules, d'abord en fuseau ou en triangle curviligne à bords concaves, se divisent rapidement et donnent en trois à cinq jours des îlots de cellules polygonales jointives avec, à leur périphérie, des cellules fusiformes ou étoilées poussant vers l'extérieur.

Lorsque le tiers au moins de la surface de la lamelle est occupé

par ces îlots de cellules, mais avant qu'ils n'aient conflué, le tube est prêt pour la suite des manipulations.

E — *Accumulation des mitoses*

Nous avons choisi, pour obtenir ce résultat, de faire subir aux cultures des variations thermiques (Chèvremont et Chèvremont-Comhaire, 1956).

Au moment choisi, les tubes sont sortis de l'étuve et abandonnés à la température du laboratoire (16 à 20° C.) pendant 24 heures.

Ils sont alors remis à l'étuve pour une durée de 14 heures, pendant laquelle va se produire une véritable flambée de mitoses. Après ce délai, la culture est interrompue par choc hypotonique, premier temps de la technique histologique de mise en évidence des chromosomes.

II. — *TECHNIQUE HISTOLOGIQUE D'ÉTUDE DES CHROMOSOMES*

La technique utilisée est voisine de celle de Lejeune, Turpin et Mlle Gauthier (1959) et associe successivement :

- Un choc hypotonique dispersant les chromosomes;
- Une fixation brutale;
- Le séchage des lames à l'air;
- Une hydrolyse par l'acide chlorhydrique normal à 60° C;
- Une coloration des chromosomes au bleu de Unna.

A — *Choc hypotonique*

Il est vite apparu nécessaire d'étendre la dilution du sérum recommandée par Lejeune. Nous utilisons, en raison de la meilleure tolérance des cellules de souche à l'hypotonie, une dilution de sérum dans l'eau distillée à raison de une partie de sérum pour huit parties d'eau.

Le tube à lamelle, vidé de son milieu, est rincé au sérum physiologique. La mamelle reste à l'intérieur du tube et n'en sortira qu'après fixation.

Le tube égoutté est alors rempli à mi-hauteur de la dilution de sérum, puis bouché et porté à l'étuve à 37° C pour 35 minutes.

B — *Fixation et séchage*

Le tube est vidé, égoutté et une quantité de mélange de Carnoy (chloroforme, 3 volumes; acide acétique, 1 volume; alcool absolu, 6 volumes) suffisante pour immerger toute la lamelle y est alors versée. On laisse agir 45 minutes.

Au bout de ce temps, le fixateur est vidé et le tube est abandonné débouché plusieurs heures ou une nuit entière pour assurer l'évaporation du Carnoy et le séchage de la lamelle.

Pour la suite des manipulations, la lamelle est sortie du tube.

C — *Hydrolyse chlorhydrique*

L'hydrolyse des cellules s'effectue dans l'acide chlorhydrique normal, au bain-marie à 60° C, pendant 8 minutes. Elle est suivie d'un rinçage soigneux dans l'eau distillée, à plusieurs reprises.

Il est nécessaire d'utiliser un acide fraîchement titré et de respecter les données de ce temps délicat.

Cette hydrolyse fait disparaître la membrane et le cytoplasme des cellules et laisse adhérer au verre les chromosomes qui, lors de la coloration, ressortiront avec un meilleur contraste sur un fond non coloré.

D — *Coloration*

Les lamelles sont alors recouvertes de solution de Bleu de Unna R.A.L. extemporanément filtrée. Le temps de contact est de 10 minutes.

La coloration est suivie d'un rinçage soigneux à l'eau distillée neutre. Puis les lamelles sont passées rapidement dans l'alcool absolu. Un dernier séchage à l'air précède le montage au baume.

Dans ces conditions, en raison du grand nombre des chromosomes, les cellules, parfaitement dispersées, sont rares (1/100 environ, 1 à 10 par lamelle): les mitoses utilisables siègent surtout à la périphérie des îlots cellulaires et leurs chromosomes sont colorés en bleu-violet foncé.

E — *Photographie*

Les cellules favorables sont photographiées sur film 24×36 (microfilm Kodak, photomicroscope Zeiss). Les négatifs sont agrandis au tirage, donnant des positifs d'un grossissement d'environ 3.000, un peu variable suivant la dispersion des chromosomes de la cellule choisie.

Ces clichés servent au décompte des chromosomes.

Les images des chromosomes des meilleurs d'entre eux sont découpées, assemblées en caryotype, collées puis rephotographiées.

III. — RÉSULTATS

Les résultats de ces études se limitent aux anomalies chromosomiques constatées au cours des mitoses des cellules de la souche HeLa issue d'un épithélioma du col utérin et de la souche Hep 2, issue d'un épithélioma du plancher de la bouche.

A — *Morphologie des chromosomes des cellules étudiées*

Les cellules ont, pour la plupart, des chromosomes d'aspect en tout point identique à celui observé pour des cellules normales, sans aucune altération morphologique apparente. En particulier, il n'a pas été observé de chromosomes dicentriques (comme en avait vu Chu en 1958 dans la souche HeLa, clone S₃/RA 1), ni de chromosomes en anneaux, ni d'inégalité flagrante des chromatides.

De rares cellules comportent toutefois un nombre de chromosomes à ce point élevé qu'ils sont incomptables du fait de leur mauvaise dispersion; le plus souvent très raccourcis, très « contractés », ils réalisent par leur petite taille une miniature de chromosomes normaux. Exceptionnellement, quelques cellules en mitose donnent naissance à un grand nombre de petits amas de chromatine fragmentée où l'on ne peut plus reconnaître de chromosomes; de telles cellules sont déjà d'une taille et d'une morphologie anormales dans l'intervalle des mitoses.

Les cellules en voie d'endoreduplication comme celle de la figure 3 sont également exceptionnelles.

B — *Nombre de chromosomes*

De nombreuses mitoses échappent à toute possibilité de numération précise de chromosomes insuffisamment dispersés. Cette difficulté s'accroît évidemment avec l'augmentation du nombre des chromosomes au sein de la cellule; c'est là une cause d'erreur statistique commune à toutes ces recherches.

Le décompte des chromosomes nous a donné:

a) En ce qui concerne la souche HeLa, les chiffres suivants

pour les 16 cellules étudiées avec précision :

nombre de chromosomes :	67	70	71	73	74	76	79	
nombre de cellules	:	1	1	2	2	5	3	2

b) En ce qui concerne la souche Hep 2, les chiffres suivants pour les 17 cellules étudiées avec précision :

nombre de chromosomes :	65	71	72	73	75	77	78	79	88	133	137	
nombre de cellules	:	1	1	1	2	1	4	2	2	1	1	1

Ces résultats concordent avec ceux trouvés par d'autres auteurs. Ils confirment l'hétérogénéité des souches. Il n'y a jamais aucune cellule exactement tétraploïde, mais rien que des cellules aneuploïdes, même lorsque, comme c'est le cas pour la souche Hep 2, on trouve deux modes, l'un à 77 chromosomes, l'autre à 135.

Pour la souche HeLa est à noter un maximum de cellules ayant 74 chromosomes, le nombre des autres s'étageant de 67 à 79; la mauvaise dispersion des cellules HeLa, de nombre chromosomique élevé, a empêché toute numération précise, mais il existe dans cette souche également une catégorie de cellules dont le nombre chromosomique semble être aux environs de 140, comme nous avons pu le constater.

Rapprochés des résultats antérieurs de Hsu et Levan, ces constatations dans des repiquages actuels montrent que le nombre chromosomique des cellules HeLa s'est peu modifié depuis 1957 et que celui des cellules Hep 2 semble remarquablement stable depuis 1956.

C — *Caryotype des cellules*

Les chromosomes de ces cellules de souche cancéreuse ayant un aspect parfaitement normal, leur classement a été établi sur le modèle proposé à Denver pour les cellules normales.

a) *Difficulté du classement des chromosomes*

Le classement n'a pourtant pas toujours été facile.

Dans le groupe 1 à 5, il y a peu de difficultés de classement, sauf parfois en ce qui concerne un grand chromosome isolé (cellules Hep 2 N° 5 et 6).

Dans le groupe 6 à 12, il est impossible de classer les chromosomes avec quelque certitude. Nous avons autant que possible respecté l'ordre de taille et groupé les chromosomes en fonction de la position du centromère. Il nous est arrivé de classer des chromosomes d'aspect et de taille voisins de ceux du groupe 6 sous la rubrique « X », mais sans aucune certitude; voire de placer hors des cadres préparés des chromosomes non caractéristiques ou surnuméraires.

Dans le groupe 13 à 15, les chromosomes sont très caractéristiques et classés sans ambiguïté. Chez l'individu normal, les paires 13 et 14 sont de taille égale et 13 se différencie par de petits bras hétérochromatiques (satellites); la paire 15 est normalement un peu plus petite. Les chromosomes représentant ces diverses variétés sont ici en nombre parfois élevé, mais jamais aucun satellite n'a pu être retrouvé.

Les chromosomes 16, strictement médiocentriques, n'offrent pas d'ambiguïté et sont également parfois très normaux.

Les chromosomes 17 à 20 n'offrent pas non plus de difficulté de classement.

Les chromosomes 21 et 22 sont pratiquement impossibles à distinguer l'un de l'autre, car ici encore les bras hétérochromatiques caractéristiques des chromosomes 21 n'ont pas été retrouvés.

Enfin, en raison de l'extrême aneuploïdie de ces cellules, les chromosomes sexuels, qui sont en général identifiés par exclusion, ne peuvent être distingués avec certitude.

La disparition des bras hétérochromatiques des chromosomes 13 et 21 est probablement un caractère particulier de ces caryotypes car on s'expliquerait mal qu'une défaillance de coloration touche de façon identique toutes les préparations.

b) *Variabilité des caryotypes :*

Une extrême variabilité existe dans les caryotypes de ces cellules cancéreuses de souche; elle est même retrouvée dans les cellules de nombre chromosomique identique (Hep 2 N° 3 et 4; N° 5 et 8). Il est ainsi évident que l'aneuploïdie de ces cellules ne

s'exprime pas seulement par des anomalies de chromosomes, mais aussi par une grande diversité de caryotypes.

L'appréciation de la fixité d'un clone ne devrait donc pas porter seulement sur l'étude du nombre chromosomique, comme on le fait assez généralement, mais comporter aussi l'étude du caryotype.

Pourtant, les chromosomes de certaines cellules peuvent être facilement classés par quatre, presque comme pour des cellules tétraploïdes vraies (cellule Hep 2 N° 7); mais ces cellules étant hypotétraploïdes, certaines variétés chromosomiques sont peu représentées, ce qui laisse vides ou peu remplies les classes correspondantes.

c) *Présence de nombreux chromosomes de certaines variétés*

Bien que le nombre chromosomique de ces cellules soit hypotétraploïde, il arrive que certaines classes comptent plus de quatre chromosomes. Il en est ainsi dans beaucoup de caryotypes.

La cellule HeLa N° 1 possède 6 chromosomes de la classe 5

—	N° 1	—	7	—	—	16
—	N° 2	—	5	—	—	11
	N° 2	—	6	—	—	12
—	N° 3	—	5	—	—	17
—	N° 4	—	5	—	—	11

La cellule Hep 2 N° 3 possède 5 chromosomes de la classe 1

—	N° 3	—	5	—	—	14
—	N° 3	—	6	—	—	20
—	N° 5	—	6	—	—	16
—	N° 6	—	6	—	—	6
—	N° 6	—	5	—	—	10
—	N° 6	—	5	—	—	16
	N° 7	—	14		—	(13-14-15)
—	N° 7	—	10	—	—	(19-20)
—	N° 8	—	6	—	—	16
—	N° 8	—	6	—	—	17
—	N° 8	—	7	—	—	19

Certains chromosomes surnuméraires sont très caractéristiques, tels :

- le chromosome 1 de la cellule Hep 2 N° 3 ;
- les chromosomes 16 de la cellule Hep 2 N° 5 et N° 8 ;
- le groupe 13-14-15 de la cellule Hep 2 N° 7.

On ne saurait les confondre avec d'autres et nous avons vérifié sur les lames qu'ils ne peuvent provenir de mitoses voisines.

Pour expliquer leur présence, il est au moins deux hypothèses :

Dans la première hypothèse, ces chromosomes proviennent de modifications subies par des chromosomes de taille supérieure et qui auraient perdu au moins en partie leurs bras. Ceci peut expliquer la multiplicité des petits chromosomes 13-14-15, mais pas l'existence d'un cinquième grand chromosome 1 dans la cellule Hep 2 N° 3.

La seconde hypothèse fait intervenir ce que l'on sait sur le mécanisme d'apparition de l'aneuploïdie. On sait que, pour Levan, l'aneuploïdie des cellules de souche résulte schématiquement d'une duplication chromosomique suivie de perte de chromosomes au cours de mitoses anormales (cf. page 29). La duplication chromosomique semblant se réaliser avec exactitude même à partir de cellules aneuploïdes (cf. fig. 3), il faudrait admettre que, dans le cas de la cellule Hep 2 N° 3 au moins, l'aneuploïdisation a joué sur une cellule qui, pour posséder cinq grands chromosomes 1, a dû subir deux fois au moins des mécanismes de duplication chromosomique.

L'extrême variabilité du caryotype des cellules étudiées ne peut résulter que de remaniements incessants de leurs chromosomes sous l'influence permanente de processus de polyploïdisation et d'aneuploïdisation se succédant en ordre anarchique.

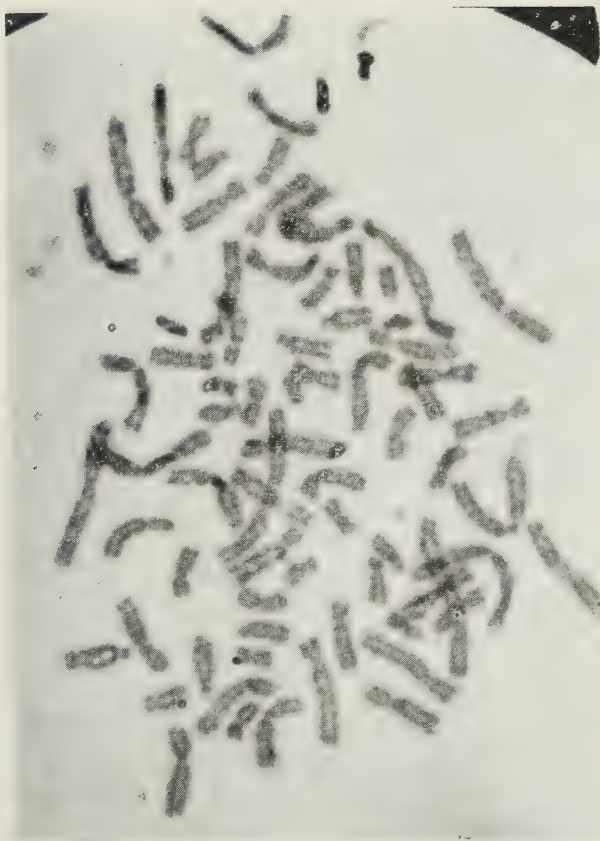


Fig. 4. — Cellule n° 1 de la souche HeLa
(Caryotype au verso)

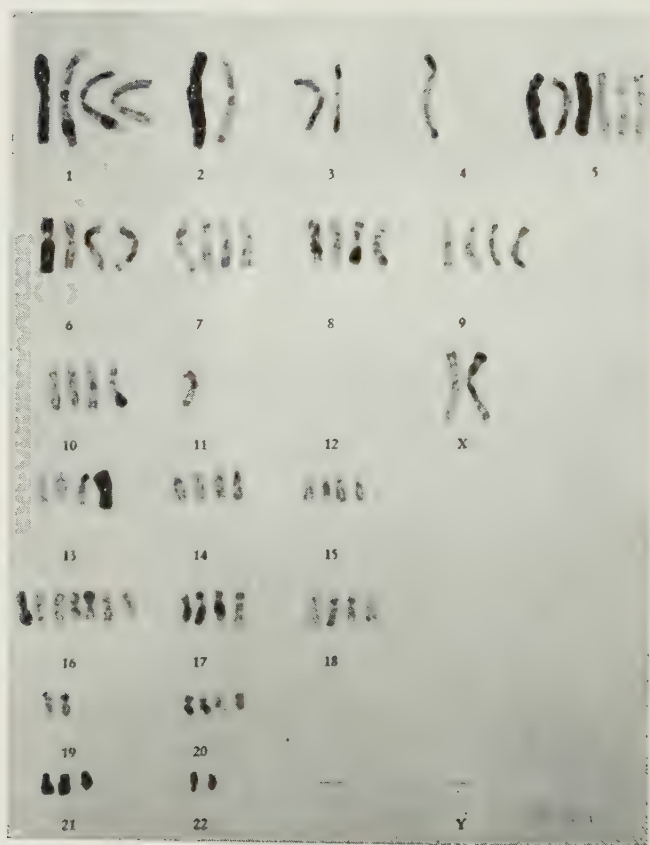


Fig. 5. — Caryotype de la cellule n° 1 de la souche HeLa
(76 chromosomes)



Fig. 6. — Caryotype de la cellule n° 2 de la souche HeLa
(75 chromosomes)

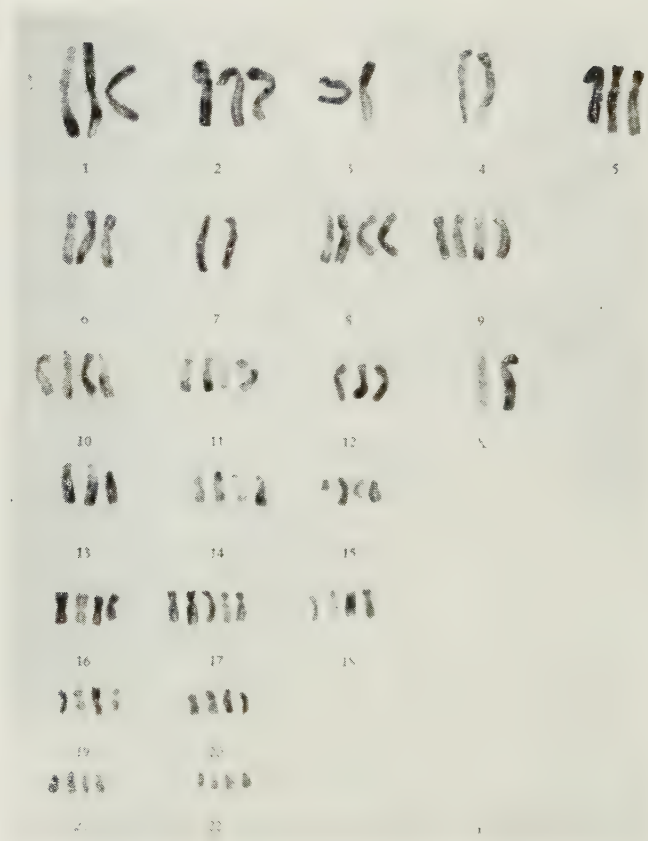


Fig. 7. — Caryotype de la cellule n° 3 de la souche HeLa
(79 chromosomes)

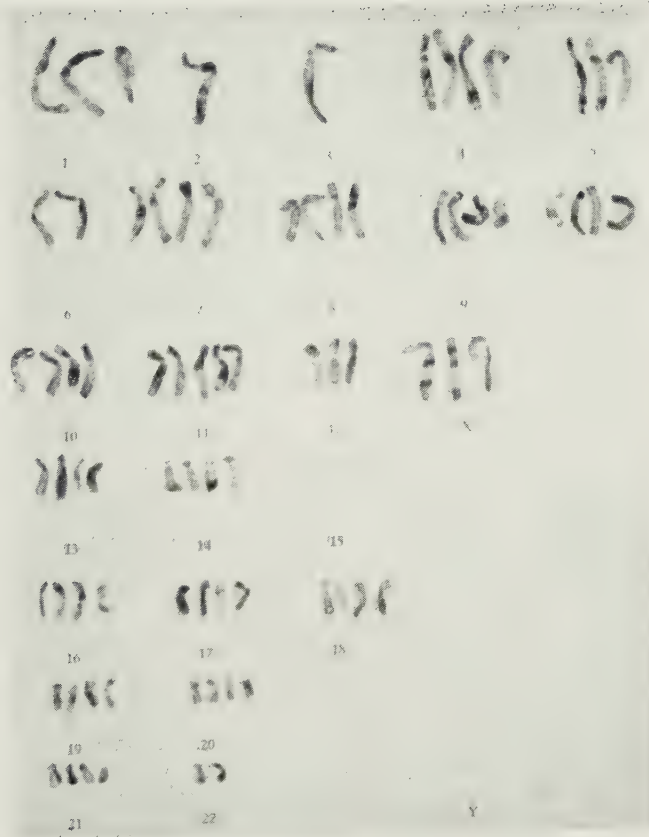


Fig. 8. — Caryotype de la cellule n° 4 de la souche HeLa
(79 chromosomes)

(très différent de la cellule n° 3 qui a le même nombre de chromosomes)

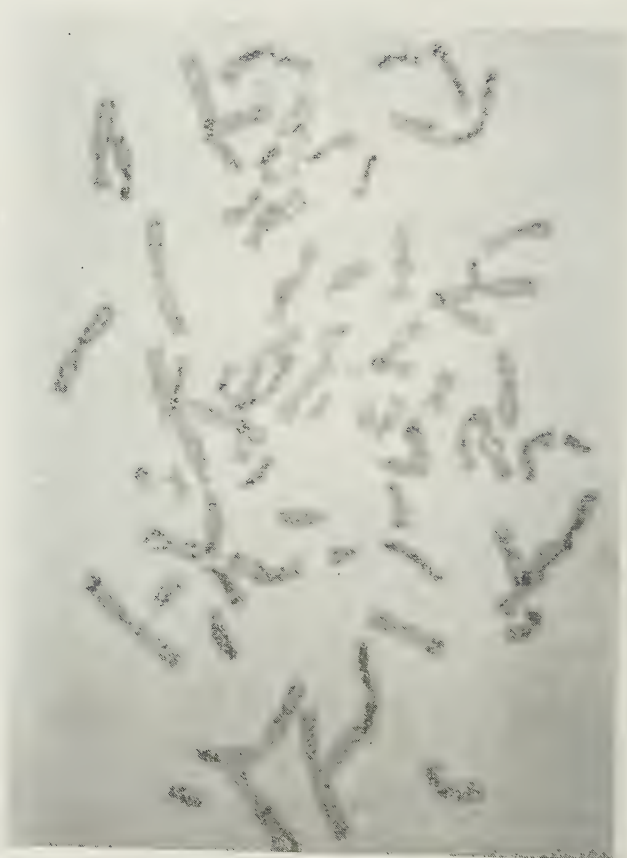


Fig. 9. — Cellule n° 1 de la souche Hep²
(Caryotype ci-contre)

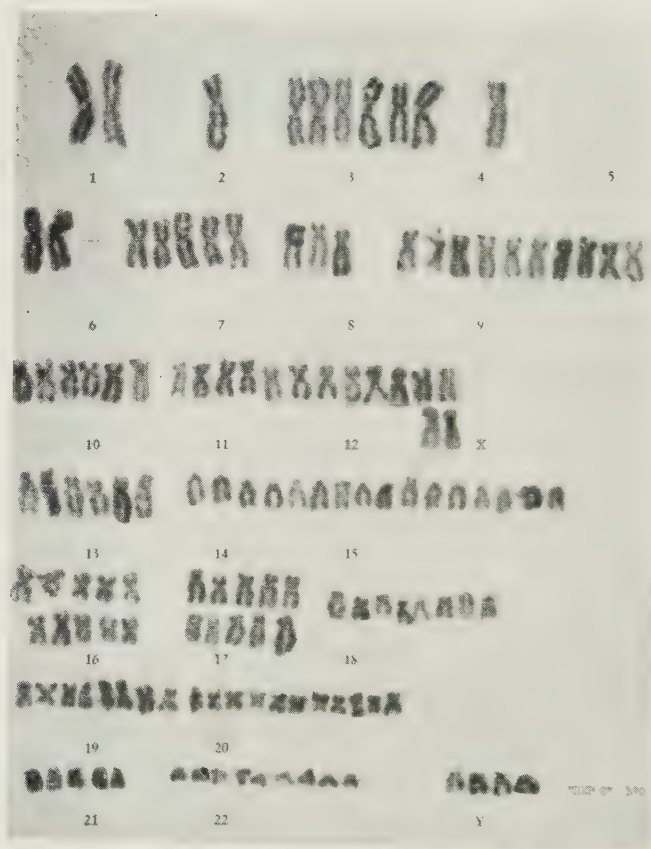


Fig. 11. — Caryotype de la cellule n° 2 de la souche Hep²
(127 chromosomes)



Fig. 12. — Caryotype de la cellule n° 3 de la souche Hep²
(77 chromosomes)

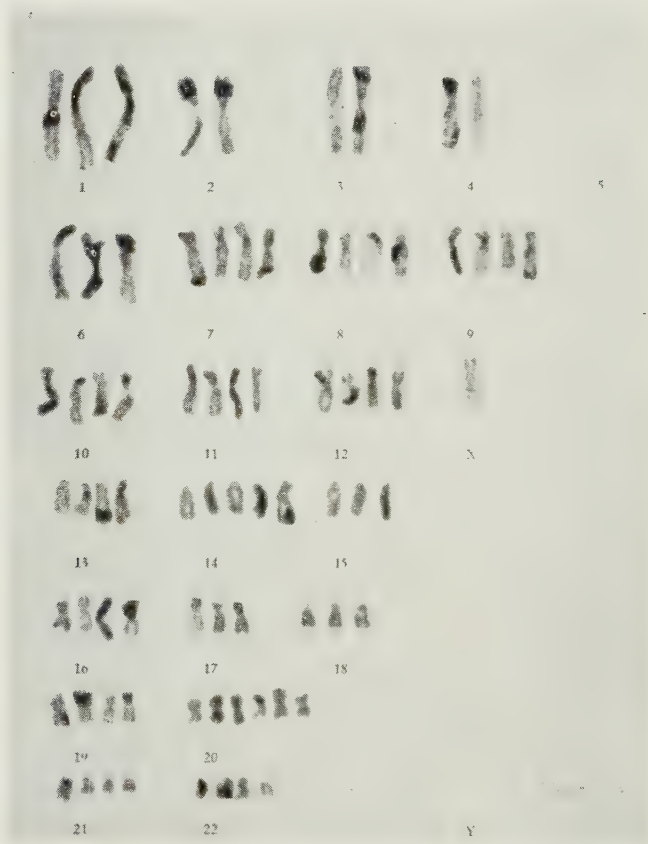


Fig. 13. — Caryotype de la cellule n° 4 de la souche Hep²
(77 chromosomes)

Comparer à la cellule Hep² N° 3

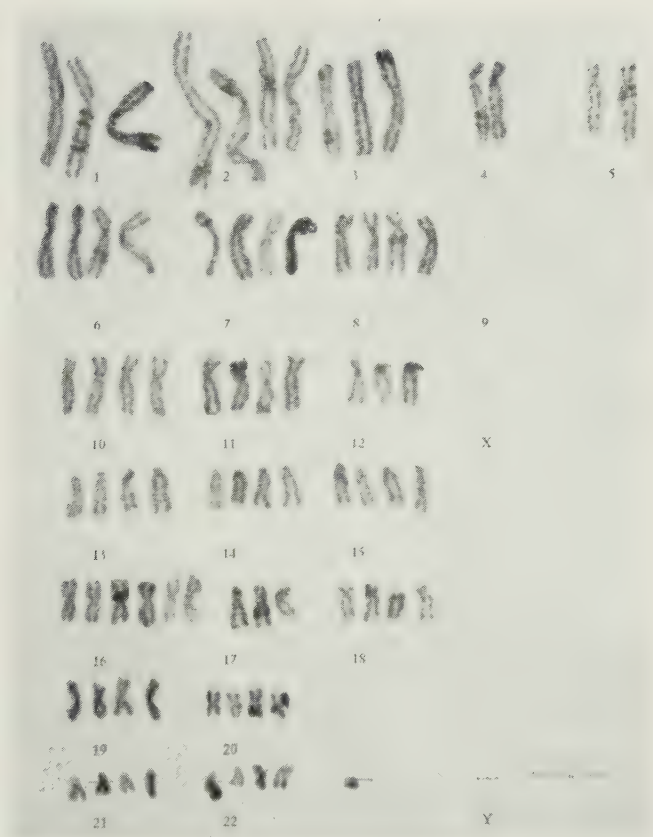


Fig. 14. — Caryotype de la cellule n° 5 de la souche Hep²
(79 chromosomes)

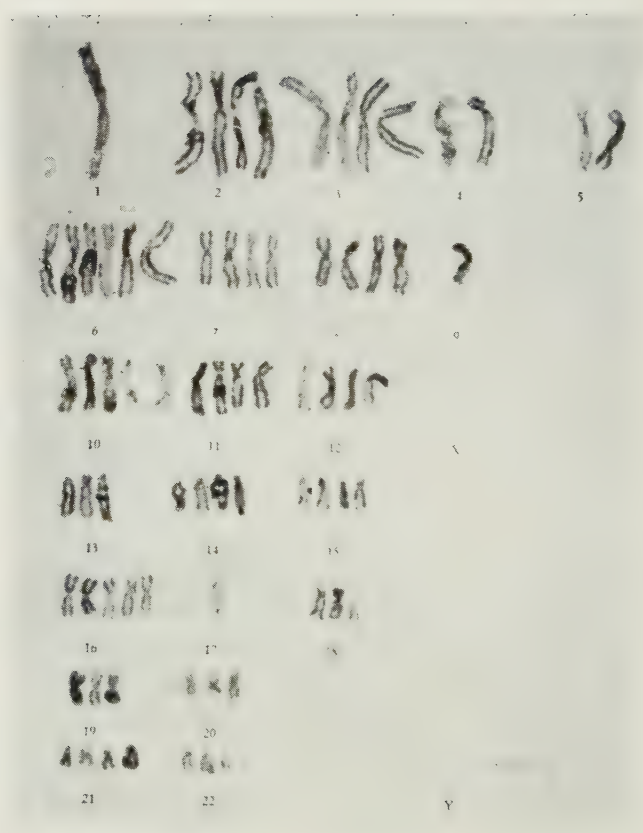


Fig. 15. — Caryotype de la cellule n° 6 de la souche Hep²
(75 chromosomes)

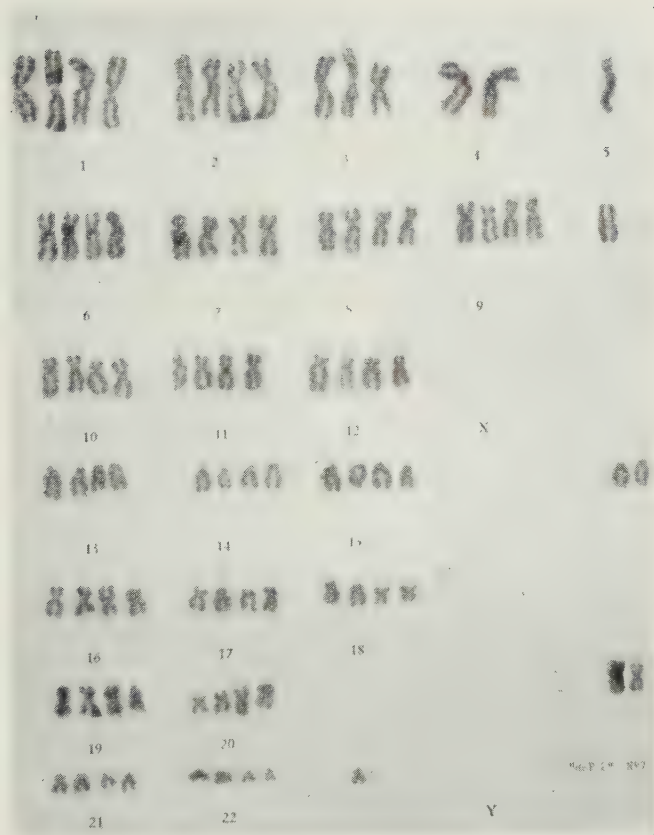


Fig. 16. — Caryotype de la cellule n° 7 de la souche Hep²
(88 chromosomes)

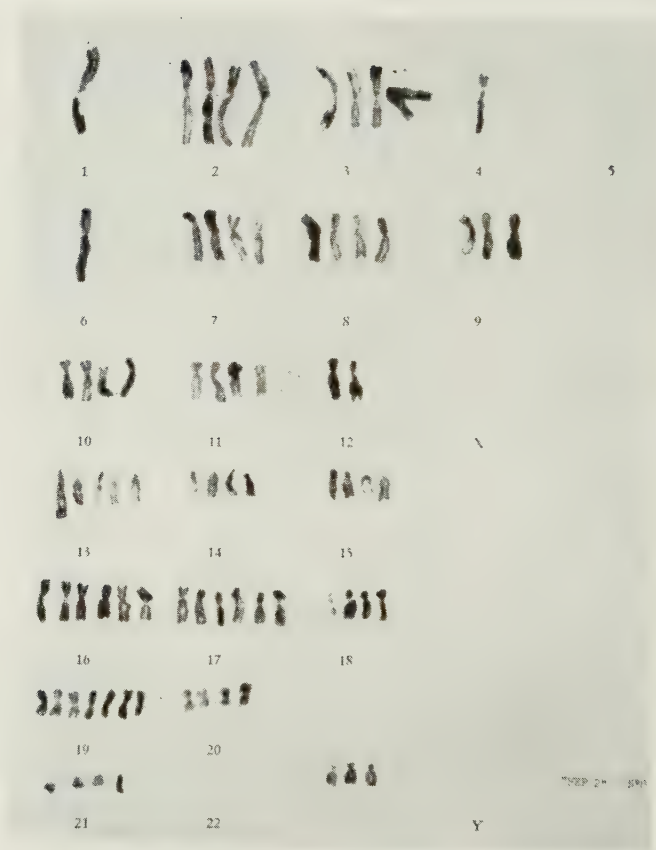


Fig. 17. — Caryotype de la cellule n° 8 de la souche Hep²
(79 chromosomes)

Comparer à la cellule Hep² N° 5

CONCLUSIONS

La culture des cellules de souche ou de tissu explanté a fait de considérables progrès depuis quelques années.

Les cultures ainsi obtenues permettent, par des moyens simples et grâce à l'usage de techniques bien établies, de mettre en évidence avec une précision jamais encore égalée les chromosomes des cellules en métaphase. Ceci est rendu possible par l'action successive : d'artifices visant à accumuler les mitoses dans les cultures considérées, d'un choc hypotonique entraînant une dispersion des chromosomes au sein du cytoplasme de la cellule hyperhydratée, puis d'une fixation suivie de dessiccation ramenant tous les chromosomes sur le même plan optique. La microphotographie des cellules aux chromosomes bien dispersés et sans entrecroisement, permet les études morphologiques sur des agrandissements photographiques de grossissement d'environ 3.000; elle permet aussi, l'image de chaque chromosome étant découpée, de reconstituer des paires de chromosomes de taille identique dont le centromère se trouve dans la même position, et de déterminer ainsi avec précision le caryotype des cellules considérées.

Cette méthode a amené la découverte d'anomalies chromosomiques diverses au cours de maladies humaines (mongolisme) et de préciser le sexe chromosomique dans bien des cas d'anomalies sexuelles.

Il était tentant d'utiliser cette méthode pour étudier les cellules cancéreuses en culture.

Le nombre chromosomique des cellules somatiques humaines normales est de 46; mais celui des cellules cancéreuses semble parfois normal et parfois très anarchique.

Ces perturbations du caryotype résultent de mécanismes successifs de duplication chromosomique (polyploïdisation) puis de pertes de chromosomes (aneuploïdisation) lors de mitoses anormales.

Les mitoses anormales conduisant à l'aneuploïdie s'observent en culture de tissus normaux dans certaines conditions d'anaérobiose relative. C'est ainsi que la plupart des souches cellulaires issues d'explants de tissu normal ont pris au cours des repiquages successifs des caractères histologiques, biochimiques et chromosomiques qui les rendent indiscernables des souches directement issues de cancer.

De plus, ces mitoses anormales, dans le tissu cancéreux, sont particulièrement nombreuses, non pas dans les zones périphériques d'accroissement de la tumeur, mais dans les zones centrales mal vascularisées. Ainsi, bien des aspects cytologiques considérés comme caractéristiques de la cellule cancéreuse sont peut-être plus liés aux conditions d'environnement qu'au cancer lui-même.

Si l'on songe que nombre d'explants primaires de tissu cancéreux ont d'abord un nombre chromosomique normal, on peut penser que l'origine de l'affection est une altération infra-chromosomique qui libère la cellule des mécanismes régulateurs de la croissance cellulaire, ou qui parfois peut s'inscrire dans le caryotype, comme il a été démontré tout récemment à propos des leucémies myéloïdes chroniques humaines.

Dans les expériences que nous rapportons, nous avons comparé les caryotypes des cellules de souche HeLa et Hep 2, souches issues de cancers épithéliaux humains. Nous avons pu confirmer que leur nombre chromosomique était extrêmement variable et se situait entre 70 et 80 dans la majorité des cas, c'est-à-dire que ces cellules sont franchement aneuploïdes.

Nous avons pu constater que ces chromosomes ne se différencient pas par leur morphologie des chromosomes des cellules normales, mais que leur nombre total et leur répartition dans chaque groupe s'écarte notablement des caryotypes normaux. De plus, la comparaison des caryotypes de ces cellules montre que, lorsque le nombre chromosomique est identique, les caryotypes peuvent différer par la répartition des chromosomes dans chaque groupe, ce qui confirme l'extrême hétérogénéité de ces souches.

Enfin, nous avons pu constater que le nombre de certains chromosomes particulièrement remarquables dans le caryotype de certaines cellules Hep 2 force à admettre que les deux processus de duplication chromosomique et d'aneuploïdisation se reproduisent souvent au cours des divisions de ces cellules, et dans un ordre anarchique.

Vu, le Doyen :

L. BINET.

Vu, le Président de Thèse :

F. P. MERKLEN.

Vu et permis d'imprimer.

Le Recteur de l'Académie de Paris,
Vice-Président du Conseil
de l'Université de Paris,

Jean SARRAILH.

BIBLIOGRAPHIE

- ALFERT M., GESCHWIND, I.I. — *The development of polysomaty in rat liver.* — *Exp. Cell. Res.* 1958, 15, 230.
- ASH HURIT, D.E. BEDFORD, O., COOMBS, R.A. — *Blood group antigens on human epidermal cells.* — *Nature*, 1956, 178, 1170.
- ASTRUP T., FISCHER A., VOLKERT M. — *Protein metabolism of tissue cells in vitro : II - Accessory growth substances in animal and vegetal tissues.* — *Acta physiol. Scand.* 1945, 9, 134.
- ATKIN N. B. — *Sex chromatin and chromosomal variation in human tumours.* *Acta unio internationale contra cancerum.* — 1960, XVI, n° 1.
- AWANO I., TUDA F. — *The chromosomes of stomach cancers and myelogenous leukaemias in comparision with normal human complex.* *Jap. J. Genet.* 1959, 34, 220.
- AYRE J. E. — *The precancer cell : a new problem in cancer research.* *Ann. NY, Acad. Sc.* 1955, 63, 1262.
- BAIKIE A. G., COURT BROWN W. M., JACOBS P. A., MILNE J. S. — *Chromosome studies in human leucemia.* *Lancet* 1959, 2, 425.
- BAIKIE A.G., COURT BROWN W. M., JACOBS P. A. — *Chromosomes studies in leukemia.* *Lancet* 1960, i, 280; i, 168.
— *Chromosome constitution of mongols with leukemia.* *Lancet* 1960, i, 1251.
- BAIKIE A. G., COURT BROWN W. M., BOCKTON K. E., HARNDEN D. G., JACOBS P. A., TOUGH I. M. — *A possible specific chromosome abnormality in human chronic myeloid leukemia.* *Nature* 1960, 188, 1165.
- BAJER A. — *Cine-micrographic studies of mitosis. V. Formation of the metaphase plate.* *Exp. cell research* 1958, 15, 370.
- BAKER L. E., EBELING A. H. — *Artificial maintenance media for cell and organ cultivation. V. The cultivation of fibroblasts in an artificial and serumless media* *J. exp. Med.* 1939, 69, 365.
- BAKER L. E. — *Artificial media for the cultivation of fibroblast epithelial cells and monocytes.* *Science* 1936, 83, 605.
- BAPAT C.V., KAMAL J., RANADIVE K. J., KHANOLKAR V. R. — *In vitro cultivation of an acid fast myco bacterium isolated from human lepromatous leprosy.* *The indian J. of Path. and Bact.* 1959 I, 156.
- BARSKI G., MAURIN J., WIELGOSZ G., LEPINE P. — *Conditions de nutrition cellulaire in vitro en culture sous support plasmatique. Rôle des fractions micro et macromoléculaires.* *Ann. Inst. Past.* 1951, 81, 9.

- BAYREUTHER K. — *Chromosomes in primary neoplastic growth. Nature* 1960, 186, 4718.
- BEATTY R. A. — *How many chromosomes in mammalian somatic cells ? Intern. Rev. Cytol.* 1954, 3, 177.
- BERGMAN L., STULBERG C. S., RUDDLE P. — *Long term culture of human bone marrow. Blood* 1955, 10, 896.
- BERGMAN L., STULBERG C. S. — *Eight culture strains (Detroit) of human epithelial like cells. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1956, 92, 730.
- BERGER C. A. — *Multiplication and reduction of somatic chromosome groups as a regular developmental process in the mosquito Culex pipiens. Carnegie Inst. Wash. Pub.* 1938, 476, 209.
- BIESELE J.J., POYNER H., PAINTER T. S. — *Nuclear phenomena in mouse cancer. Univ. Tex. Pub.* 1942, n° 4243, 7.
- BIESELE J. J., COWDRY E. V. — *Chromosomal changes in epidermal carcinogenesis. J. Nat. Carci. Inst.* 1943, 4, 373.
- BLATTNER R. J. — *Chromosomal pattern in man. J. Pediat. St-Louis.* 1959, 55, 249.
- BOOK J. A., FRACCARO M., LINDSTEN J. — *Cytogenetical observations in mongolism. Acta Paediat.* 1959, 48, 483.
- BOOK J.A., SANTESSON B. — *Malformation syndrome in man associated with triploidy. Lancet* 1960, 1, 858.
- BOOTHROYD E. R., WALKER B. E. — *Somatic chromosome number in mice. Records genetic. Soc. of America* 1952, 21, 11.
- BOROWSKI, CHWISTECKA, KURYLO-BOROWSKA. — *Simple method of preparing serum dialysate for tissue culture. Bull. inst. Mar. Trop. Med. Gdansk.* 1955, 6, 221.
- BRYANT J. C., EARLE W. R., PEPPERS E. V. — *The effect of ultracentrifugation and hyaluronidase on the filtrability of chick embryo extract for tissue culture. J. Nat. Canc. Inst.* 1953, 14, 189.
- CAILLEAU, RELDA, KIRK. — *Some factors affecting the growth promoting properties of serum in tissue culture. Tex. Rep. Biol. Med.* 1957, 15, 237.
- CAILLEAU R., HOARD D., ZITCER E. M. — *Chemical composition of some sera et cells used in tissue culture fatty acids, lipid phosphorus content. Tex. Rep. Biol. Med.* 1957, 15, 250.
- CAMERON Gladys. — *Tissue culture technique. New-York, Academic Press. Inc.* 1950.
- CAMPBELL A. — *Synchronizaton of cell division. Bact. Rev.* 1957, 21, 263.
- CARREL A., EBELING A.R. — *Heterogenic serum age, et mutiplication of fibroblasts. J. Exp. Med.* 1922, 35, 17.
- CARREL A., EBELING A. H. — *Heat et growth inhibiting action of serum. J. Exp. Med.* 1922, 35, 647.
- CHANG R. S. — *Continuous Subcultivation of epithelial like cells from normal human tissues. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1946, 87, 440.

- CHEVREMONT-COMHAIRE S. et FREDERIC J. — *Contribution à l'étude de la mitose des cellules vivantes privées d'oxygène en culture de tissus*. C.R. Soc. Biol. (Paris) 1955, 149, 211.
- CHEVREMONT et CHEVREMONT M. — *Action de température subnormale suivie de réchauffement sur les mitoses*. C.R. Soc. Biol. (Paris) 1956, 150, 1046.
- CHROMOSOMES OF MAN. — *Lancet* 1959, (7075), 715.
- CHU E.H.Y., GILES N.H. — *A study of primate chromosomes complements*. Amer. Nat. 1957, 91, 273.
Comparatives chromosomal studies on mammalian cells in culture. — I. The HeLa strain and its mutant clonal derivatives. J. Nat. Canc. Inst. 1958, 20, 383.
Human chromosomes complements in normal somatic cells in culture. Am. J. Human Genet. 1959, 11, 63. — *The chromosomes of man*. Lancet 1959, 7075, 715.
- COHN E. J., STRONG L.E., HUGUES W. L., MULFORD D.J., ASWORTH J.N., MELIN M., TAYLOR M.M. — *Préparation et propriétés of serum and plasma protein. V. A system for the separation into fractions of the protein and the lipoprotein components of biological tissues and fluids*. J. Am. Chim. Soc. 1946, 68, 459.
- COMAN. — *Human neoplasm in tissue culture*. Cancer Research 1942, 2, 618.
- COSTEROT, POMERAT, JACKSON. — *Tumors of the human nervous system in tissue culture. I : The cultivation and cytology of meningioma cell*. J. Nat. Cancer Inst. 1955, 15, 1319.
 II : *An analysis of fibroblastic activity in meningiomas*. J. Nat. Cancer Inst. 1955, 15, 1341.
- COURT BROWN W.M., JACOBS P.A., DOLL R. — *Interpretation of chromosome counts made on bone marrow-cells*. Lancet, 1960, i, 160.
- COWDRY E.V. — *Malignant properties of cancer cells*. Ann. NY Acad. Sc. 1956, 63, 1046.
- DALES D. — *A study of the fine structure of mammalian somatic chromosomes*. Exp. cell Res. 1960, 19, 577.
- DELHANTY J., ELLIS J.R., ROWLEY. — *Triploid cell in a human embryo*. Lancet 1961, i, 1286.
- DI STEFANO M.S., DIERMEIER M.F., TEPPERMAN J. — *Effect of growth hormone on nucleic acid and protein content of rat liver cells*. Endocrinology 1955, 57, 158.
- DOLJANSKI, HOFFMAN, TENENBAUM. — *Effects of extracts of heterologous adult tissue on cell growth in vitro and their use in wound healing*. Nature 1942, 150, 23.
- DUSTIN P., PARMENTIER R. — *Données expérimentales sur la nature des mitoses anormales observées dans certains épithéliomas du col utérin*. Gynécol. Obst. 1953, 52, 258.
- EAGLE H. — *The specific amino acid requirement of a human carcinoma cell (strain HeLa) in tissue culture*. J. exp. Med. 1955 a, 102, 37.

- The minimum vitamins requirements of the L. et HeLa cells in tissue culture, the production of specific vitamin deficiency and their cure. *J. Exp. Med.* 1955 b, 102, 595.
- Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma strain KB. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1955 c, 89, 362.
- Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture *Science*. 1955 a, 122, 501.
- Utilisation of dipeptides by mammalian cells in tissue culture. *Proc. soc. exp. Biol. Med.* 1955 e, 89, 96.
- The specific amino- acid requirement of a mammalian cell strain L in tissue culture. *J. Biol. Chem.* 1956 a, 214, 939.
- Relative growth promoting activity in tissue culture of co-factor and the parent vitamins. *Proc. Soc. Exp. Biol. NY* 1956 c, 91, 358.
- Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* 1959, 130, 432.
- EAGLE H., FREEMAN A.E., LEVY. — The amino-acid requirements of monkey kidney cells in first culture passage. *J. exp. Med.* 1958, 107, 64.
- EAGLE H., HABEL K. — The nutritional requirement for the propagation of poliomyelitis virus by the HeLa cell. *J. exp. Med.* 1956 b, 104, 271.
- EAGLE, OYAMA V.I., LEVY M., HORTON C., FLEISHMAN R. — The growth response of mammalian cells in tissue culture to L Glutamine and L glutamic acid *J. Biol. Chem.* 1956, 218, 607.
- EAGLE H., OYAMA V.I., LEVY M., FREEMAN A.E. — Myo-Inositol as essential growth factor of normal and malignant human cells in tissue culture. *J. of Biol. Chem.* 1957 a, 226, 191.
- Science* 1956 b, 123, 847.
- EAGLE H., OYAMA V.I., LEVY M. — Amino-acid requirement of normal and malignant cells in tissue culture. *Arch. Bioch. et Biophysics.* 1957 b, 67, 432.
- EAGLE H., PIEZ K.A., FLEISHMAN R. — The utilisation of phenylalanine and tyrosine for protein synthesis by human cells, in tissue culture. *J. of Biol. Chem.* 1957, 228, 847.
- EARLE W. R. — Production of malignancy in vitro. IV : The mouse fibroblast cultures and changes seen in living cells. *J. Nat. Canc. Inst.* 1943, 4, 165.
- Long term, large scale tissue culture. In : *Preservation and Transplantation of normal tissues.* Wolstenholme GEW and Cameron M.P. Eds. Ciba Foundation — London Churchill Ltd. 1954.
- Long term cultivation of animal tissue cells in large cultures. *Fed. Proc.* 1958, 17, 967.
- EARLE W. R., BRYANT J. C., SCHILLING E. L., EVANS V.J. — Growth of cells suspensions in tissue culture. *Ann. NY Acad. Sc.* 1956, 63, 666.
- EARLE W.R., NETTLESHIP A. — Production of malignancy in vitro. V. Results of injections of cultures into mice. *J. Nat. Canc. Inst.* 1943, 4, 213.
- EARLE W.R., SCHILLING E.L., BRYANT J.C., EVANS V.J. — The growth of pure strain L cells in fluid suspension cultures. *J. Nat. Canc. Inst.* 1954, 14, 1159.
- EARLE W.R., SHELTON E., SCHILLING E.L. — Production of malignancy in vitro. XI. Further results from reinjection of in vitro cell strain CH3 mice. *J. Nat. Cancer Inst.* 1950, 10, 1105.

- EASTY G.L., EASTY D.M., AMBROSE E.J. — *Studies of cellular adhesiveness. Exp. cell. Res.* 1960, 19, 539.
- EDWARDS R.G. — *Colchicine induced heteroploidy in the mouse. I. The induction of triploidy by treatment of the gametes. J. Exp. Zool.* 1958, 137, 317.
— *Colchicine induced heteroploidy in mouse. II. The induction of tetraploidy and other types of heteroploidy. J. Exp. Zool.* 1958, 137, 349.
— *Painless skin biopsy. Lancet* 1960, i, 496.
- EHRENSWARDS G., FISCHER A., STJERHOLM R. — *Protein metabolism of tissue cells in vitro. 7. The chemical nature of some obligate factors of tissue cell nutrition. Acta Physiol. Scandinav.* 1948, 18, 218.
- EK., J.I., FALK V., BERGMAN S., REITALU J. — *A male mongoloid with 46 chromosomes. Lancet* 1961, ii, 526.
- ELMHORT L. — *On the chromosome number of human sternal marrow. Acta Path. et Microb. scand.* 1958, 43, 241.
- ENDERS. — *Tissue culture in the study of immunity : retrospection et anticipation. J. Immunology* 1954, 73, 62.
- EVANS V.J., BRYANT J.C., SANFORD K.K., EARLE W.R. — *Studies of certain defined media for testing proliferation in replicate tissue culture. Ann. N.Y. Acad. SC.* 1954, 58, 1012.
- EVANS V.J., BRYANT J.C., Mc QUILKIN W.T., FIORAMONTI M.C., SANFORD K.K., WESTFALL B.B., EARLE W.R. — *Studies of nutrient media for tissue cells in vitro. II : An Improved protein free chemically defined medium for long term cultivation of strain. 929 cells. Cancer research* 1956, 16, 87.
- FAUTREZ J., VAKAET L., VAN STREIJTHEM. — *Action antimitotique des stéroïdes cortico-surrénaux sur le pancréas en culture organo-typique. Rev. Fr. Et. Cl. Biol.* 1960, 5, 608.
- FELL H.B. — *Ostéogenesis in vitro. Arch. F. Exp. Zellforsch.* 1931, II, 245.
— *Recent advances in organ culture. Sc. Prog.* 1953, 162, 212.
- FERGUSON-SMITH M.A. — *Cytogenetics in man. AMA Arch. Int. Med.* 1960, 105, 627.
- FISHMANN M. — *Antibody formation in tissue culture. Nat.* 1959, 183, 1200.
- FISHER A. — *Nature of the growth accelerating substance of animal tissue cells. Nat.* 1939, 144, 113.
— *Nature of growth promoting substances in embryonic tissue juice : Review of own investigation. Acta Physiol. Scand.* 1941, 3, 54.
- FISCHER A. — *Biology of tissue cells. London, Cambridge University Press* 1946. N.Y. : Stechert et Co.
Tissue culture. Levni and Munkgaard pub. Copenhagen.
— *Amino acid metabolism of tissue cell in vitro. Biochem. J.* 1948, 43, 491.
— *Studies of the culture of leucemic cells in vitro. Ann. N.Y. Ac. Sc.* 1958, 76, 673.
- FISCHER A., ASTRUP T., EHRENVARD G., OHLENSCHLAGER V. — *Growth of animal tissue cells in artificial media. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1948, 67, 40

- FISCHER H.W., PUCK T.T., SATO G. — Molecular growth requirement of single mammalian cells : The action of fetuin in promoting cell attachment to glass. *Proc. Nat. Acad. Sc.* 1958, **44**, 4. — *Science* 1957, **126**, 961.
- FORD C.E., HAMERTON J. L. — A colchicine hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain Tech.* 1956, **31**, 247.
— The chromosomes of man. *Nat. London* 1956, **178**, 1020. — *Acta Genetica* 1956, **6**, 264.
- FORD C.E., JACOBS P.A., LAJTHA L.G. — Human somatic chromosomes. *Nat.* 1958, **4623**, 1565.
- FORD C.E., HAMERTON J.L., MOLE R.H. — Chromosomal changes in primary and transplanted reticular neoplasms of the mouse. *J. Cell. and comp. physiol.* 1958, **52** (suppl. 1), 235.
- FORD C.E., MOLE R. M. — Chromosome studies in human leukaemia. *Lancet* 1959, **ii**, 732.
- FRACCARO M. — Cell cultures for human genetic studies and concluding remark. *Am. J. Human Genet.* 1960 **a**, **12**, 134.
- FRACCARO M., GEMZELL C.A., LINDSTEN J. — Plasma level of growth hormone and chromosome complement in four patients with gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Acta Endocrin.* 1960 **b**, **39**, 496.
- FRACCARO M., KAIJSER K., LINDSTEN J. — Somatic chromosome complement in continuously cultured cells of two individuals with gonadal dysgenesis. *Ann. Hum. Genet.* 1960 **c**, **24**, 45.
- FRANCIS M.D., WINNICK T. — Studies on the pathway of protein synthesis in tissue culture. *J. Biol. Chem.* 1953, **202**, 273.
- FREED J.J., HUNGERFORD D.A. — DNA content of nuclei and chromosome number in sublines of the Ehrlich Ascites Carcinoma. *Canc. Res.* 1957, **17**, 177.
- FRISCH A.W., JENTOFT V., BARGER R., LOSLI E.J. — A human epithelium-like cell derived from an adenocarcinoma of lung. *Am. J. clin. Path.* 1955, **25**, 1107.
- FRITZ NIGGLI H. — Die Chromosomen im menschlichen Mamma Karzinom. *Acta Union Intern. Contra Cancrum* 1956, **12**, 623.
- GAGNON J. — Les chromosomes de l'homme. *Union med. Canad.* 1960, **89**, 1286.
- GAILLARD J.J. — Parathyroid gland tissue and bone in vitro. *Exp. Cell. Res.* 1955, **3**, 154.
- GALTON M., BENIRSENKE K. — Forty-six chromosomes in an ovarian teratoma. *Lancet* 1959, **ii**, 761.
- GAUTIER M. — Etude des chromosomes humains sur les cultures de tissus. *Bull. et Mém. de la Soc. Méd. des Hôp. de Paris* 1959, **28**, 956.
- GEITLER R. — Die Analyse des Kernbaus und des Kernteilung der wasserläufer *GERRIS lateralis* und *GERRIS lacustris* und die Somadifferenzierung. *Z. Zellforsch* 1937, **26**, 641.
- GELFANT. — Antephase and DNA doubling. *Exp. cell research* 1958, **15**, 423.
- GESCHWIND I. I., ALFERT M., SCHOOLEY C. — Liver regeneration and hepatic polyploidy in the hypophysectomized rat. *Exp. cell research* 1958, **15**, 232.

- GEY G.O. — *Improved technique for massive tissue culture*. *Am. J. Canc.* 1933, 17, 752.
- GEY G.O., HANKS J.H., BARRET. — *Retardation of growth and metabolism of normal and malignant cells during continuous cultivation*. *Growth* 1948, 12, 69.
- GEY G.O., GEY M.K., FIROR W.M., SELF W.O. — *Cultural studies on normal and malignant cells of specific in vitro origin. Conversion of normal into malignant cells*. *Acta unio intern. contra cancerum* 1949, 6, 706.
- GEY G.O., COFFMANN W.D., KOBICEK M.T. — *Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium*. *Cancer Res.* 1952, 12, 264.
- GOLDBLATT H., CAMERON G. — *Induced malignancy in cells from rat myocardium subjected to intermittent anaerobiosis during long propagation in vitro*. *J. Exp. Med.* 1953, 97, 525.
- GOLDSTEIN G., MYRVIK Q.N. — *The reversible and irreversible effect of anti-HeLa cell rabbit serum upon human cell lines in tissue culture*. *J. of Immunology* 1958, 80, 100.
- GORER P. A. — *The value of Ascites cells in problems of tumor immunity*. *Ann. NY Acad. Sc.* 1956, 63, 882.
- GROUCHY (J. de). — *L'hérédité moléculaire*. — *Analecta genetica*. Edizioni dell'Istituto Gregorio Mendel; Rome 1958.
- GROUCHY (J. de) et LAMY M. — *Etude des chromosomes humains à partir de leucocytes sanguins*. *Rev. Fr. Et. Cl. Biol.* (à paraître).
- GROUCHY (J. de), LAMY M., YANEVA H., SALOMON Y., NETTER A. — *Further abnormalities of the X chromosome in primary amenorrhoea or in severe æigomenorrhoea*. *Lancet*, ii, 778, 1961.
- Groupe d'étude de Denver. — *A proposed standard system of nomenclature of human mitotic chromosome*. *Ann. Hum. Gen.* 1960, 24, 319.
— *Système standard de nomenclature des chromosomes mitotiques humains*. *Ann. Gen.* 1960, 2, 635.
- HANKS J.H. — *The longevity of chick tissue culture without renewal of medium*. *J. Cell and Comp. Physiol.* 1948, 31, 235.
- HANKS J. H., WALLACE R.E. — *Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissue by refrigeration*. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 1949, 71, 196.
- HANSEN-MELANDER E., KULLANDER S., MELANDER Y. — *Chromosome analysis of a human ovarian cystocarcinoma in the ascites form*. *J. Nat. Cancer Inst.* 1956, 16, 1067.
- HARDEN D.G. — *A Human skin culture technique used for cytological examination of number of different pathological conditions*. — *Brit. J. Exp. Path.* 1960, 41, 31.
- HARRIS and HARRIS. — *Studies on the transfer of lymph node cells*. — III. *Effects of variation in the intervals between the injection of antigen into the donor and collection of its lymph nodes*. — IV. *Effect of X-irradiation of recipient rabbits on the appearance of antibody after cell transfer*. — *J. Exptl. Med.* 1954, 100, 269 et 289.

- HARRISON R.G. — Observations on the living developping nerve fiber. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1907, 4, 140.
- HAUSCHKA T.S. — Relationship between chromosome ploidy and histocompatibility in mouse ascites tumors. *Cancer Res.* 1952, 12, 269.
— Cell population studies on mouse ascites tumors. *Trans. NY. Acad. Sci.* 1953, sér. II, 16, 64.
— Correlation of chromosomal and physiologic changes in tumors. *J. Cell. and Comp. Physiol.* 1958, 52 (suppl. 1), 197.
- HAUSCHKA T.S., KVEDAR B.J., GRINNEL S.T., AMOS D.B. — Immuno-selection of polyploids from predominantly diploid cell population. *Ann. N.Y. Acad. Sc.* 1956, 63, 683.
- HAUSCHKA T.S., LEVAN A. — Characterization of five ascites tumors with respect to chromosome ploidy (Abstracts). *Anat. Rec.* 1951, 111, 467.
- HAUSCHKA T.S., LEVAN A. — Inverse relationship between chromosome ploidy and host specificity of sixteen transplantable tumors. *Exp. Cell Res.* 1953, 4, 457.
- HEALY G.M., FISCHER D.C., PARKER R. L. — Nutrition of animal cells in tissue culture. IX : Synthetic medium 703. *Canad. J. Biochem. and. Physiol.* 1954, 32, 327.
- HEALY G.M., FISCHER D.C., PARKER R.L. — Nutrition of animal cells in tissue culture. X : Synthetic medium n° 858 *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)* 1955, 89, 71.
- HEALY G.M., MORGAN M.F., PARKER R.C. — Trace métal content of some natural and synthetic media. *J. Biol. Chem.* 1952, 198, 305.
- HOGMAN C.F. — Blood group antigen on human cells in tissue culture. The effect of prolonged cultivation. *Exp. Cell Res.* 1960, 21, 137.
- HSU T.C. — Mammalian chromosomes in vitro. I. : The caryotype of man. *J. Heredity*, 1952, 43, 167.
— Tissue culture studies on human skin. III : Some cytological features of the outgrowth of epithelial cells. *Tex. Rep. Biol. Med.* 1952, 10, 336.
— Human chromosomes as revealed by treating cells in tissue culture with hypotonic solution. *Proc. Am. Ass. Cancer Res.* 1953, 1, 25.
— Variation of chromosome number in tissue culture. *Anat. Rec.* 1953, 115, 325.
— Abnormal mitosis in neoplastic cells and its implication on dynamic cytology. *Genetics*, 1954 a, 39, 973.
— Cytological studies on HeLa, a strain of human cervical carcinoma. I : Observations on mitosis and chromosomes. *Tex. Rep. Biol. Med.* 1954 b, 12, 833.
— Mammalian chromosomes in vitro. IV : Some human neoplasms. *J. Nat. Cancer Inst.* 1954 c, 14, 905.
— Mammalian chromosomes in vitro. VI : Observations on mitosis with phase contrast cinematography. *J. Nat. Cancer Inst.* 1955, 16, 691.
- HSU T. C. — Chromosomes of neoplasms. *Fundamental Aspects of Normal and Malignant Growth.* Nowinski Edit. Amsterdam.
- HSU T.C., KELLOG G. Jr. — Primary cultivation and continuous propagation in vitro of tissues from small biopsy specimens. *J. Nat. Canc. Inst.* 1960, 25, 221.

- HSU T. C., KLATT O. — *Mammalian chromosome in vitro. IX : On genetic polymorphism in cell populations.* J. Nat. Canc. Inst. 1958, 21, 437.
- *Mammalian chromosomes in vitro. X : Heteroploid transformation in neoplastic cells.* J. Nat. Cancer Inst. 1959, 22, 313.
- HSU T.C., MOORHEAD P.S. — *Chromosomal anomalies in human neoplasms with special reference to the mechanism of the polyploidization and aneuploidization in the HeLa strain.* Ann. N.Y. Acad. Sc. 1956, 63, 1083.
- *Mammalian chromosomes in vitro. VII : Heteroploidy in human cell strains.* J. Nat. Cancer Inst. 1957, 18, 463.
- HSU T.C., POMERAT C.M. — *Mammalian chromosomes in vitro. II : A method for spreading the chromosomes of cells in tissue culture.* J. Heredity, 1953, 44, 23.
- *Mammalian chromosomes in vitro. III : On somatic aneuploidy.* J. Morph. 1953, 93, 301.
- HSU T.C., POMERAT C.M., MOORHEAD P.S. — *Mammalian chromosomes in vitro. VIII : Heteroploid transformation in the human cell strain Mayes.* J. Nat. Cancer Inst. 1957, 19, 867.
- HUGUES A. — *The mitotic cycle.* N.Y. Acad. Press. Inc. 1952, 240 p.
- HUNGERFORD D.A., DONNELLYNA J., NOWELL P. C., BECK S. — *The chromosome constitution of a human phenotypic intersex.* Am. J. Hum. Genet. 1959, 11, 215.
- ISHIHARA T. — *A chromosomal study in five near diploid human tumors.* Jap. Journ. Genet. 1959 a, 34, 23.
- *Some aspects on the chromosomes of a human gastric carcinoma in the ascites forms.* Jap. Journ. Genet. 1959 b, 34, 28.
- *Cytological studies of tumors. XXXI : A chromosome study in a human gastric carcinoma.* Gann. 1959 c, 50, 403.
- ISING U. — *Effects of heterologous transplantation on chromosomes of ascites tumors; a contribution to our knowledge of environmental influence on tumor cells.* Acta Path. Microb. Scand. 1958, suppl. 127, 1-102.
- ISING U., LEVAN A. — *The chromosomes of two highly malignant human tumors.* Acta Path. Microb. Scand. 1957, XL, 40, 13.
- JACOBS, P.A., HARNDEN D.G., COURT BROWN W.M., BAIKIE A.G. — *The somatic chromosomes in Mongolism.* Lancet 1959, 1, 710.
- *Trisomic condition of a large chromosome.* Lancet 1960, ii, 368.
- JACOBSON W., WEBB B. — *The two types of nucleoproteins during mitosis.* Exp. Cell. Research, 1952, 3, 163.
- *Nucleoproteins and cell division.* Endeavour, 1952, 11, 200.
- JACQUEZ J.A., BARRY E. — *Tissue culture media; The essential non dialyzable factors in human placental cord serum.* J. Gen. Physiol. 1951, 34, 765.
- JENSEN A.B., HARRIS L. — *The behaviour of chick heart fibroblast in some protein-free media.* Exp. Cell Res. 1952, 3, 706.
- JORDAN W.E. — *Human nasal cells in continuous culture : Establishment of two lines of epithelial-like cells.* Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1956, 92, 867.

- KAZIWARA K. — Derivation of stable polyploid sublines from a hyperdiploid Ehrlich ascites carcinoma. *Cancer Res.* 1954, 14, 795.
- KELUS, GURNER, COOMBS. — Blood group antigens on HeLa cells shown by mixed agglutination. *Immunology*, 1959, 2, 262.
- KIELER J. — The influence of amino-acids on mitotic activity in fibroblast cultures. IV : Effects of methionine, cysteine, tryptophane, proline. *Acta Path. Scand.* 1954, 34, 1.
— Relations among amino-acids. *Acta Path. Scand.* 1954, 34, 11.
- KIRSCHBAUM A. — The role of hormones in cancer. *Laboratory Animals. Canc. Res.* 1957, 17, 433.
- KODANI M. — The supernumerary chromosome of man. *Am. J. Human Genetics*, 1958, 10, 125.
- KOLLER P.C. — Abnormal mitosis in tumors. *Brit. J. Cancer* 1947, 1, 38.
— Cytological variability in human carcinomatosis. *Ann. N.Y. Acad. Sc.* 1956, 63, 793.
— Chromosome polymorphism in normal and cancer tissues. *Proc. Zool. Soc. Calcutta, Mookerjee Memor.* 1957, vol. 81.
- KUCHLER R.J., MARLOWE M.L., MERCHANT D.J. — The mechanism of cell binding and cell sheet formation in L strain fibroblasts. *Exp. cell. Res.* 1960, 20, 428.
- KUTSKI R.J. — Stimulating effect of nucleoprotein fraction of chick embryo extract on homologous heart fibroblasts. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 1953, 83, 390.
- KUTSKI R.J., HARRIS M. — Growth promoting agents in cell fraction of chick embryos. *J. Cell. Comp. Physiol.* 1954, 43, 193.
- LA COUR L.F., PELC S.R. — Effect of colchicine on the utilisation of labelled thymidin during chromosomal reproduction. *Nature*, 1958, 182, 506.
- LAJTHA L.G. — Culture of human bone marrow in vitro. *J. Clin. Path.* 1952, 5, 67.
— The culture of bone marrow cells in vitro. *Brit. Med. Bull.* 1959, 15, 47.
- LAJTHA L.G., OLIVIER R., ELLIS F. — Deoxyribonucleic acid synthesis in bone marrow studied by autoradiography. *Radiobiology symposium. Butterworth Scientific Publications, London* 1955 (p. 216).
- LAMBERT R.A. — Comparative studies upon cancer cells and normal cells. II : The character of growth in vitro with special reference to cell division. *J. Exptl. Med.* 1913, 17, 499.
- LEBLOND C.P. — Classical technics for the study of the kinetics of cellular proliferation. *The Kinetics of cellular proliferation, Grune and Stratton, N.Y.* 1959, p. 31.
- LEDERBERG J. — Prospects for a genetics of somatic and tumor cells. *Ann. N.Y. Acad. Sc.* 1956, 63, 662.
- LEIGHTON J., KLINE I. — Studies on human cancer using sponge matrix tissue culture. *Tex. Rep. Biol. Med.* 1954, 12, 847.
- LEIGHTON J., KLINE I., ORR H.C. — Transformation of normal fibroblast into histologically malignant tissue in vitro. *Science* 1956, 123, 502.

- LEJEUNE J. — *On two possible markers of chromosomal aberrations induced by X rays in human cell.* Internat. Jour. of Rad. Biol. 1960 suppl.
- LEJEUNE J., TURPIN R., GAUTIER M. — *Le mongolisme; maladie chromosomique (trisomie)* C.R. Acad. Nat. Med. 1959 a, 143, 256.
— *Le mongolisme, premier exemple d'aberration autosomique humaine.* Ann. Gen. 1959 b, 1, 64.
- LEJEUNE J., GAUTIER M., TURPIN R. — *Les chromosomes humains en culture de tissu.* C.R. Acad. Sc. 1959 c, 248, 802.
— *Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens.* C.R. Acad. Sc. 1959 a, 248, 1721.
- LE PAGE G.A., GREENLEE J., FERNANDEZ J. F. — *Studies of nucleic acid synthesis in ascites tumor cells.* Ann. NY. Acad. Sc. 1956, 63, 999.
- LEPINE P., SLIZEWICZ P., DANIEL P., PACCAUD M. — *Cultures cellulaires dans un milieu utilisant l'hydrolysé de caséine comme source d'acides aminés.* Ann. Inst. Past. 1956, 90, 654.
- LESLIE, FULTON W.C., SINCLAIR R. — *Biochemical tests for malignancy applied to a new strain of human cells.* Nature 1956, 178, 1179.
- LECHTENBERGER C., HELWEG LARSEN H. Fr., MURMANIS L. — *Relationship between hereditary pituitary dwarfism and the formation of multiple desoxyribose nucleic acid (DNA) classes in mice.* Lab. Invest. 1954, 3, 245.
- LEVADITI. — *Symbiose entre le virus de la poliomyélite et les cellules des ganglions spinaux à l'état de survie prolongée in vitro.* C.R. Soc. Biol. 1913, 74, 1179.
— *Virus de la poliomyélite et culture de cellules in vitro.* C.R. Soc. Biol. 1913, 75, 202.
- LEVAN A. — *Cytological phenomena connected with the root swelling caused by growth substances.* Hereditas, 1939, 25, 87.
— *Colchicine induced C-mitosis in two mouse ascites tumors.* Hereditas, 1934, 40, 1.
— *Chromosome studies on some human tumors and tissues of normal origin grown in vivo and in vitro at the Sloan Kettering Institute.* Cancer, 1956 a, 9, 648.
— *The significance of polyploidy for the evolution of mouse tumors strains of the TA 3 mammary adenocarcinoma with different ploidy.* Expl. Cell Res. 1956 b, 11, 613.
— *Chromosomes in cancer tissue.* Trans. N.Y. Acad. Sc. 1956 c, 63, 774.
— *Self perpetuating chromosome in two human tumors.* Hereditas 1956 d, 42, 366.
— *Cancer chromosomes.* XIth International Congress of Genetics Montreal 1958, p. 20.
- LEVAN A., BIESELE J.J. — *Role of chromosomes in cancerogenesis as studied in serial tissue cultures of mammalian cells.* Ann. N.Y. Acad. Sc. 1958, 71, 1022.
- LEVAN A., HAUSCHKA T.S. — *Chromosome numbers of three mouse ascites tumors.* Hereditas, 1952, 38, 251.
— *Endomitotic reduplication mechanisms in ascites tumors of the mouse.* J. Nat. Cancer Inst. 1953, 14, 1.
- LEVINTHAL C. — *The mechanism of deoxyribonucleic acid replication and genetic recombination in phage.* Proc. Nat. Acad. Sc. U.S. 1956, 42, 394.

- LEVINTOW L., EAGLE H., PIEZ K. A. — *The role of glutamine in protein biosynthesis in tissue culture.* *J. Biol. Chem.* 1957, 227, 929.
- LEVINTOW L. — *Evidence that glutamine is a precursor of asparagine in a human cell tissue culture.* *Science*, 1957, 126, 611.
- LEWIS W. K., LEWIS M.R. — *The cultivation of chick tissues in media of known chemical constitution.* *Anat. Rec.* 1912, 6, 207.
- LIEBERMAN I., OVE R. — *Purification of a serum protein required by a mammalian cell in tissue culture.* *Bioch. Bioph. Acta* 1957, 25, 449.
- LOCKART R.Z., EAGLE H. — *Requirement for growth of single human cells.* *Science* 1959, 129, 252.
- Mc CARDLE R.C. — *Characteristics of mitosis in tumor cells.* *Ann. N. Y. Acad. Sc.* 1956, 63, 1079.
- Mc COY T.A., MAXWELL M., NEUMANN R.E. — *The amino-acid requirements of the Walter carcino-sarcome 256 in vitro.* *Cancer Res.* 1956, 6, 979.
- Mc QUILKEN W.J., EVANS V.J., EARLE W.R. — *The adaptation of additional lines of NCTC clone 929 (strain L) cells to chemically defined protein free medium NCTC 109.* *J. Nat. Cancer Inst.* 1957, 19, 885.
- MAKINO S. — *Cytologic studies on cancer. III : The characteristics and individuality of chromosomes in tumor cells of the Yoshida sarcoma which contribute to the growth of the tumor.* *Gann.* 1952, 43, 17.
- *A cytological study of the Yoshida sarcoma, an ascites tumor of white rats.* *Chromosoma*, 1952, 4, 649.
- *A review of the chromosome numbers in animals.* 2^o Con. Tokyo 1956.
- MAKINO S., ISHIHARA T., TONOMURA A. — *Cytological studies of tumors. XXVII : The chromosomes of thirty human tumors.* *Z. Krebsforsch.* 1959 a, 63, 184.
- *Chromosome conditions in thirty human tumors.* *Proc. Jap. Acad.* 1959 b, 35, 252.
- MAKINO S., KANO K. — *Cytological studies of tumors. IX : Characteristic chromosome individuality in tumor strain cells in ascites tumors of rats.* *J. Nat. Cancer Inst.* 1953, 13, 1213.
- MAKINO S., NAKAHARA H. — *Cytological studies of tumors. X : Further observations of the living tumor cells with a new hanging drop method.* *Cytologia* 1953, 18, 128.
- MALHERBE. — *Cultivation of human tissues in media containing bovin allantoic and amniotic fluid.* *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1954, 86, 124.
- MANNA G.K. — *Handling human chromosomes by a coumarin technic.* *Stain Technol.* 1956 a, 31, 45.
- *A study on chromosomes of the human non neoplastic and neoplastic uterine tissues.* *Proc. Internat. Genet. Symp.* 1956 b Tokyo and Kyoto. — *Cytologia Suppl.* 182.
- *A study on the chromosome number of human neoplastic uterine cervix tissue.* *Proc. Zool. Soc. Calcutta Mookerjee Memor.* 1957, 95.
- MELANDER Y., WINGSTRAND K.G. — *Gomori's hematoxylin as a chromosome stain.* *Stain Tech.* 1953, 28, 217.

- MELLORS R. C. — *Quantitative cytology and cytopathology : Nucleic acid and proteins in the mitotic cycle of normal and neoplastic cells.* Am. N.Y. Acad. Sc. 1956, 63, 1177.
- MELNICK J.L., RIORDAN J.J. — *Poliomyelitis virus in tissue culture. IV : Protein free nutrient media in stationary and roller tube cultures.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1952, 81, 208.
- MILLIAN S.T., ROBBINS. — *In vitro cultivation of porcine kidney.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1956, 91, 548.
- MONTEZUMA de CARVALHO J., CRAWLEY J.C.W. — *The fixation of chromosomes for electron microscopy.* Exp. Cell Res. 1960, 20, 211.
- MOORE A.E. — *Criteria of malignancy. II : Biological consideration of normal and abnormal cell lines.* Trans. N.Y. Acad. Sc. 1957, 19, 435.,
- MOORE A.E., SABACHEWSKI L., TOOLAN H.W. — *Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells.* Cancer Res. 1955, 15, 598.
- MOORE A.E., SOUTHAM C.M., STERNBERG S. — *Neoplastic changes developing in epithelial cell lines derived from normal persons.* Science, 1956, 124, 127.
- MOORHEAD P.S., HSU T.C. — *Cytological studie of HeLa, a strain of human cervical carcinoma. III : Duration and characteristics of the mitotic phases.* J. Nat. Cancer Inst. 1956, 16, 1047.
- MOORHEAD P.S., NOWELL P.C., MELLMAN W.J., PATTIPS D.M., HUNGERFORD D.A. — *Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood.* Exp. cell Res. 1960, 20, 613.
- MORGAN J.F., CAMPBELL M.E., MORTON H.J. — *The nutrition of animal tissue cultived in vitro. I. : A survey of natural materials as supplements to synthetic medium 199.* J. Nat. Cancer Inst. 1955, 16, 557.
- MORGAN J.F., MORTON H.J., PARKER R.C. — *Nutrition of animal cells in tissue culture. I. : Initial studies on synthetic medium.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1950, 73, 1.
- MORGAN J.F., MORTON H.J. — *Studies on the sulfur metabolism of tissues cultivated in vitro. I. : A critical requirement for L-cystine.* J. Biol. Chem. 1955, 215, 539.
- MORGAN J.F., MORTON H.J., CAMPBELL M.E., GUERIN. — *The nutrition of animal tissue cultivated in vitro. II. A comparison of various synthetic media.* J. Nat. Cancer Inst. 1956, 16, 1405.
- MORTON H.J., MORGAN J.F., PARKER R.C. — *Nutrition of animal cells in tissue culture. V. : Effect of initial treatment of cultures on their survival in a synthetic medium.* J. Cell. and Comp. Physiol. 1955, 38, 389.
- MORTREUIL-LANGLOIS H. — *Determination du degré de ploïdie des noyaux hépatiques chez la souris par numération directe des chromosomes.* C.R. Soc. Biol. 1959, 152, 1485.
- MUNRO T.R. — *A technique that permits micro-manipulation and long term study of single HeLa cells and their progeny.* Exp. Cell. Res. 1960, 19, 291.
- MURRAY M.R., STOUT A.P. — *Distinctive characteristics of the sympathico blāstoma cultivated in vitro. A method for prompt diagnosis.* Am. J. Path. 1947, 23, 429.
- MURRAY M.R., STOUT A.P. — *The classification and diagnosis of human tumors by tissue culture methods.* Tex. Rep. Biol. Med. 1954, 12, 893.

- NAKAHARA H. — *Cytological studies of tumors. XI : Observations of the multipolar divisions in tumor cells of ascites tumor or rats by phase microscopy. J. Fac. Sc. Hokkaido University. 1953, 11, 473.*
- NAKANISH Y.H., FERNANDEZ M.V., MIZUTANI M., POMERAT C. M. — *On the chromosome numbers of human amnion cells in primary and strain cultures. Tex. Rep. Biol. Med. 1959, 17, 345.*
- NORRYD C. — *The chromosomes of three human cells strains. Hereditas 1959, 45, 449.*
- NOVAK A.F., HAUGE S.M. — *Some properties of an unidentified growth factor in distillers dried solubles. J. Biol. Chem. 1948, 174, 235.*
- NOWELL P.C. — *Differentiation of human leukemic leucocytes in tissue culture. Exp. cell. Res. 1960, 19, 267.*
- NOWELL P.C., HUNGERFORD D.A., BROOKS C. D. — *Chromosomal characteristics of normal and leukemic human leucocytes after short term tissue culture. Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 1958, 2, 331.*
- NOWELL P.C., HUNGERFORD D.A. — *Chromosome studies on normal and leukaemic human leucocytes. J. Nat. Canc. Inst. 1960 a, 25, 85.*
— *A minute chromosome in human chronic granulocytes leukaemia. Science 1960 b, 132, 1497.*
- OBERLING C. — *Les facteurs de la croissance cancéreuse. Les facteurs de la croissance cellulaire, activation et inhibition : Exposés annuels de Biologie cellulaire, 1956, 405.*
- OBERLING G., GAUTHIER A., BERNHARD W., HAGUENAU F. — *Les structures basophiles du cytoplasme et leurs rapports avec le cancer. Press. Med. 1953, 61, 719.*
- OBERLING G., GUERIN C. — *The role of viruses in the production of cancer. Advance in Cancer research 1954, 2, 353.*
- OEHME J. — *Chromosomenveränderungen bei Leukämie. Stsch. Med. Worsch. 1960, 85, 817.*
- OHNO J., KOVACS E.T., KINOSITA R. — *On the X chromosomes of mouse mammary carcinoma cells. Exp. cell. Research, 1959, 16, 462.*
- OKUMURA H., TAKAOKA T., KATSUTA H. — *Comparative studies on chromosomes among rat ascites hepatoma cells before and after the establishment of cell strains in tissue culture. Jap. J. Exp. M. 1959, 28, 419.*
- ORSI E.V., RITTER H.B. — *A report of sex chromatin in human tumor tissue culture. Exp. Cell. Res. 1958, 15, 244.*
- OSGOOD E.E., BROOICE J.M. — *Continuous tissue culture of leucocytes from human leucemic bloods by application of « gradient » principles. Blood, 1955, 10, 110.*
- PARKER. — *Methods of tissue culture. New-York, Paul B. Hoeber Inc. 1950, 2^e ed.*
- PASIEKA A.E., MORTON H.J., MORGAN J.F. — *The metabolism of animal tissues cultivated in vitro. I. Amino acid metabolism of chick embryonic heart fibroblasts cultivated in synthetic medium M 150. J. Nat. Canc. Institute 1956, 16, 995.*

- PENROSE L.J., DELHANTY J. — Triploid cell cultures from a macerated foetus. *Lancet* 1961, i, 1261.
- PENTTINEN K. et SAXEN E. — Effect of human sera on cultures of HeLa cells. *Ann. Med. Exp. Biol.* 1956 a, 34, 22.
 — The effect of inactivation of the serum on the growth of HeLa cells. *Ann. Med. Exptl. Fen.* 1956, 34, 242.
 — Growth controlling action of human serum in cell culture. *Nature* 1959, 184, 157.
- PERRY, EVANS, EARLE. — Cultivation of larges cultures of cells in horse serum. *Science*, 1955, 121, 805.
- PLAUT W. — The effect of tritium on the interpretation of autoradiographic studies on chromosomes. *Laboratory Invest.* 1959, 8, 286.
- PLAUT W., MAZIA D. — The distribution of newly synthetized DNA in mitotic division. *Texas Rep. Biol. Med.* 1957, 15, 181.
- POMERAT C.M., NOWINSKI W.W., ROSE G.G. — Cancer symposium : tissue culture of cells from body fluids. *Tex. Rep. Biol. Med.* 1950, 8, 521.
- POMERAT C.M. — Tissue culture methods in medical research vol. IV. Year Book Publ. 1957, 198.
- POWSNER E.R., BERMAN L. — Number of chromosomes in the human cell. *Nature* 1960, 185, 1045.
- PUCK T.T., CIECURA S.J., ROBINSON A. — Genetics of somatic mammalian cells. III : Long term cultivation of euploid cells from and animal subjects. *J. Exptl. Med.* 1958, 108, 945.
- PUCK T.T., FISHER H. W. — Genetics of somatic mammalian cells. I : Demonstration of the existence of mutants with different growth requirements in a human cancer cell strain HeLa. *J. Exp. Med.* 1956, 104, 427.
- PUCK T.T., MARKUS P. I. — A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture : the rise of X irradiated cells to supply conditioning factors. *Proc. Nat. Acad. Sc. Wash* 1955, 41, 432.
- PUCK T.T., MARKUS P.I., CIECURA S.J. — Clonal growth of mammalian cells in vitro. Growth characteristics of colonies from single HeLa cell with and without a feeder layer. *J. Exp. Med.* 1956, 103, 273.
- PUMPER R.W., ALFRED L.J. — Growth phases of mammalian cells propagated in a serum free medium. *Exp. cell Res.* 1960, 20, 630.
- QUERNER H., SUCHEZKY A. — Chromosomenzahlen in ziver Unterlinien hyperdiploidien Ehrlichschen Mause. Ascites, Tumors. *Zschr. Krebsforsch* 1958, 62, 552.
- RABOTTI G. — Ploidy of primary and metastatic human tumors. *Nature*, 1959, 183, 1276.
- RANADIVE K.J., NERURKAR R.V., KHANOLKAR V.R. — In vitro studies on human leprosy. *Ind. J. Med. Soc.* 1958, 12, 791.

- RAPPAPORT C., BISHOP C.B. — *Improved method for treating glass to produce surfaces suitable for the growth of certain mammalian cells in synthetic medium. Exp. cell Res.* 1960 a, 20, 580.
- RAPPAPORT C., POOLE J.P., RAPPAPORT H.P. — *Studies on the properties of surfaces required for growth of mammalian cells in synthetic medium. I : The HeLa cells* p. 465.
II : The monkey kidney cells p. 479 — *III : The L cells strain 929* p. 495. *Exp. cell Res.* 1960 b, 20.
- REISNER E. H. Jr. — *Tissue culture of bone marrow. Ann. N.Y. Acad. Sc.* 1959, 77, 487.
- RESCH A. — *Untersuchungen über Kerndifferenzierung in peripheren Zellschichten der Sprossachsen einiger Blütenpflanzen. Chromosoma.* 1952, 5, 296.
- REVELL S.H. — *A new hypothesis for the interpretation of chromatid aberrations and its relevance to theories for the mode of action of chemical agents. Ann. N.Y. Acad. Sc.* 1959, 68, 802.
- RICHARDS B.M., WALKER M.B., DEELY E.M. — *Changes in nuclear D.N.A. in normal and ascites tumor cells. Ann. N.Y. Acad. Sc.* 1956, 63, 831.
- ROBINEAUX R., BARSKI G. — *Chambres pour la perfusion des cultures de tissu et l'observation en microscope à contraste de phase. Mikroskopie* 1956, 11, 65.
- ROSE G. — *A separable and multipurpose tissue culture chamber. Tex. Rep. Biol. Med.* 1954, 12, 1074.
- ROSENBERG S., KIRK P.L. — *Tissue culture studies: identification of components and synthetic replacement for the active fraction of chick embryo extracts ultrafiltrate. J. Gen. Physiol.* 1953, 37, 239.
- ROSSE W.F., GURNEY C.W. — *Studies on erythropoiesis: one case of bone marrow tissue culture demonstrating erythropoietin. J. Lab. and Clin. Med.* 1959, 53, 446.
- ROTHFELD K.H., AXELRAD A.A., SIMINOVITCH L., McCULLOCH E.A., PARKER R.C. — *The origin of altered cell lines in cultures from mouse, monkey and man, as indicated by chromosome and transplantation studies. Canad. Cancer Conf.* 1959, 3, 189.
- ROTHFELD K. H., SIMINOVITCH L. — *An air drying technic for flattening chromosomes in mammalian cells grown in vitro. Stain Tech.* 1958, 33, 73.
- RUDDLE F.H., BERMAN L., STULBERG C.S. — *Chromosome analysis of five long term cell culture populations derived from non leucemic human peripheral blood (Detroit strains). Cancer Res.* 1958, 18, 1048.
- RUGE H. — *La valutazione dei cosiddetti eterocromosomi nei tessuti e nei leucociti, il loro significato per la suddivisione degli intersessi e per l'origine dei tumori, particolarmente teratomi. Rass. Internaz. Clin. Ter.* 1959, 39, 129.
- SACHS L., GAILLILLY R. — *The chromosomes and transplantability of tumors. I : Fundamental chromosome number and strain specificity in ascites tumors. J. Nat. Cancer Inst.* 1955, 15, 1267.
 — *II : Chromosome duplication and loss of strain specificity in solid tumors. J. Nat. Cancer Inst.* 1956, 16, 803.

- SAKSELA E., SAXEN E., PENTTINEN K. — *Further studies on the growth controlling action of human serum on cells cultivated in vitro. The chromosomal number of HeLa cells in active and heat inactivated serum. Exp. cell Res.* 1960, 19, 402.
- SANFORD K.K., LEADBETTER P.A., BRYANT J.C., BRAKER W.P., EVANS V.J., EARLE W.R. — *The effects of amino-acids as supplements to fractions of serum and embryo extracts on the proliferation of cells in vitro. J. Nat. Cancer Inst.* 1953, 14, 513.
- SANFORD K.K., LIKELY G.D., EARLE W.R. — *The development of variations in transplantability and morphology within a clone of mouse fibroblast transformed to sarcoma producing cells in vitro. J. Nat. Cancer Inst.* 1954, 15, 215.
- SANFORD K.K., WALTZ H.K., SHANNON J.E., EARLE W.R., EVANS V.J. — *The effects of ultrafiltrates and residues of horse serum and chick embryos extracts on proliferation of cells in vitro. J. Nat. Cancer Inst.* 1952, 13, 133.
- SANFORD K.K., WESTPHALL, FIORAMONTI. — *The effect of serum fractions on the proliferation of strain L mouse cells in vitro. J. Nat. Cancer Inst.* 1955, 16, 789.
- SATO G., FISCHER H.W., PUCK T.T. — *Molecular growth requirements of single cells. Science* 1957, 126, 961.
- SCHABERG A., de GROOT C.A. — *The influence of the anterior hypophysis on the morphology and function of the adrenal cortex in vitro. Exp. Cell Res.* 1958, 15, 475.
- SCHOYER N.H.D. — *Aetiology of leukemia. Lancet* 1960 i 229.
- SCHULTZ J. — *Malignancy and the somatic cell. Ann. N.Y. Acad. Sc.* 1958, 71, 995.
- SIMMS H.S., PARSHLEY M.S., PITT R.B. — *Fat deposition caused by lipfanogens and opposed by antilipfanogens. J. Geront.* 1947, 2, 205.
- SIRLIN J.L., KNIGHT G.R. — *Chromosomal synthesis of protein. Exp. cell Res.* 1960, 19, 20.
- SOUTHAM C.M., MOORE A.E., RHOADS S. — *Homotransplantation of human cell lines. Science* 1957, 125, 158.
- STEINER. — *Emphasis in cancer research. J. Nat. Cancer Inst.* 1954, 14, 1205.
- STEINHARDT E., ISRAELI C., LAMBERT R.A. — *Studies on the cultivation of the virus of vaccinia. J. Inf. Dis.* 1913, 13, 294.
- STERN C. — *The chromosomes of man. J. Med. Educ.* 1959, 34, 301.
- STERN C. — *Mechanisms of meiotic non disjunction in man. Nature* 1960, 187, 804.
- STEVENS K. M., Mc KENNA J.M. — *Studies on antibody synthesis initiated in vitro. J. Exp. Med.* 1958, 107, 537.
- STEWART J.S., KIRK P.L. — *The liquid medium in tissue culture. Biol. Rev.* 1954, 29, 119.
- STEWART J.S. — *Mechanism of meiotic non disjunction in man. Nature* 1960, 187, 804.

- STILWELL E.F. — Observations of endomitosis in embryonic chick cells grown *in vitro*. *Anat. Rec.* 1952, 114, 9.
- STOLTE L.A.M., von KESSEL H.I. Am., SEELEN J.C., TIJDINK G.A.J. — Chromosomes in hydatidiform moles. *Lancet* 1960, ii, 1144.
- SWARTZ F.J. — The development in the human liver of multiple desoxyribose nucleic acid (DNA) classes and their relationship to the age of the individual. *Chromosoma* 1956, 8, 53.
- SWARTZ F.J., SAMS B.F., BARTON A.G. — Polyploidization of rat liver following castration of males and females. *Exp. cell Res.* 1960, 20, 438.
- SWIM H. E., PARKER R.F. — Nonbicarbonate buffers in cell culture media. *Science* 1955, 122, 466.
- Preservation of cell cultures at 4° C. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1955, 89, 549.
- The amino-acid requirements of a permanent strain of altered uterine fibroblasts U 12/705. *Canad. J. Biochem. Physiol.* 1958, 36, 861.
- SYKES J.A., MOORE E.B. — A new chamber for tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1959, 100, 125.
- SYVERTON J.T. — Comparative studies of normal and malignant human cells in continuous culture. *Cellular Biol. Nucleic Acid Viruses. Special Publ. N.Y. Acad. Sc.* 1957, 5, 331.
- TABATA T. — A chromosome study in some malignant human tumors. *Cytologia* 1959, 24, 367.
- TAGA M., GEORGESCU V., TAGA L. CRISTEI I. — Un procédé original pour la préparation du sérum déprotéiné nécessaire aux cultures de tissu *in vitro*. *Ann. Inst. Past. Ig. Anim.* 1955, 5, 199.
- TANAKA T. — A study of the somatic chromosomes of rat. *Cytologia*, 1953, 18, 343.
- TANZER J. — Contribution à l'étude de la culture des cellules sanguines suivant les méthodes d'Osgood — Observation sur l'incorporation de la thymidine tritiée par la technique autoradiographique. Thèse Paris 1960.
- TAYLOR J.H., WOODS P.S., HUGUES W.C. — The organisation and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium labelled thymidine. *Proc. Nat. Acad. Sc.* 1957, 43, 122.
- TAYLOR J. H. — The mode of chromosome duplication in « creps capillaris ». *Exp. Cell. Res.* 1958, 15, 350.
- THOMAS, THIERY. — Emploi du liquide amniotique déprotéiné et purifié. Culture et conservation prolongée de tissus. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1953, 35, 841.
- TIMONEN S., THERMAN E. — The changes in the mitotic mechanism of human cancer cells. *Canc. Res.* 1950, 10, 431.
- TJIO, J.H., LEVAN A. — Chromosome analysis of three hyperdiploid ascites tumors of the mouse. *Lunds Univ. Arsskr.* 1954, 50, 1.
- The chromosome number of man. *Hereditas*, 1956, 42, 1.
- Comparative ideogram analysis of the rat and the Yoshida rat sarcoma. *Hereditas (Lund)* 1956, 42, 218.

- TJIO J.H., PUCK T.T. — *Genetics of mammalian cells. II : Chromosomal constitution of cells in tissue culture. J. Exp. Med.* 1958, 108, 259.
- TONOMURA A. — *A chromosome survey in six cases of human uterine cervix carcinomas. Jap. J. Genet.* 1959, 34, 401.
- TONOMURA A., YERGANIAN G. — *Aneuploidy in the regenerating liver of the chinese hamster. Genetics* 1956, 41, 664.
- TOUGH I.M., BUCKTON K., BAIKIE A.G., COURT BROWN U.M. — *X Ray induced chromosome damage in man. Lancet*, 1960, ii, 849.
- TROWELL O.A. — *The culture of lymph nodes synthetic media. Exp. Cell Research* 1955 a, 9, 258.
— *Experiments on lymph node cultures in vitro. Ann. N.Y. Acad. Sc.* 1955 b, 59, 1066.
- TYTELL A.A., NEUMAN R.E. — *Growth response of stable and primary cell cultures to L ornithine, L citrulline and L-arginine. Exp. cell. Res.* 1960, 90, 84.
- ULLOA G., BLOCKER, NOVINSKI, POMERAT C.M. — *The effect of ascitic fluid and of blood serum on the outgrowth of epidermal cells from human skin in tissue culture. Tex. Rep. Biol. Med.* 1950, 8, 400.
- VAKAET L., PINTELON L. — *Un milieu simple pour la culture d'organes in vitro. C.R. Soc. Biol.* 1959, 153, 174.
- VANN L.S. — *Possible function of protein of serum in tissue culture. Science*, 1956, 123, 326.
- VOGT M. — *A genetic change in a tissue culture line of neoplastic cells. J. Cell. Comp. Physiol.* 1958, 52 (suppl. 1) 282.
- WATSON J.D., CRICK F.H.L. — *Genetical implication of the structure of desoxyribonucleic acid. Nature* 1953, 171, 964.
- WAYMOUTH C. — *The nutrition of animal cells. International review of cytology. N.Y. Acad. Press. Inc. vol. 3, 1954, 1.*
— *Simple nutrient solution for animal cells. — Tex. Rep. Biol. Med.* 1955, 13, 522.
— *A serum free nutrient solution sustaining rapid and continuous proliferation of strain L (Earle) mouse cells. — J. Nat. Cancer Inst.* 1956, 17, 315.
- WEICKER H., TERWEY K.H. — *Die chromosomensahl der Erythroblasten. Klin. Worsch.* 1958, 36, 1132.
- WEISS L. — *Studies on cellular adhesion in tissue culture. II — Some effect of Calcium. — Exp. cell Res.* 1960, 21, 71.
- WERNER G.H. — *Virus en quête de maladie. Pr. Med.* 1956, 64, 1859.
- WHITE P.R. — *An approach to chemically defined nutrients for strain L mouse cells. J. Nat. Cancer Inst.* 1955, 16, 76.

- WILLMER E.N., KENDALL L.P. — *The utilisation of proteoses by chicken heart fibroblasts growing in vitro.* *J. Exp. Biol.* 1932, 9, 149.
- WILSON H., JACSON E.B., BRUES A.M. — *The metabolism of tissue culture. I : Preliminary studies on chick embryo.* *J. Gen. Physiol.* 1942, 25, 689.
- WINNICK R.E., WINNICK T. — *Utilisation of amino-acids, peptides and proteins by cultures of embryonic heart.* *J. Nat. Cancer Inst.* 1953, 14, 519.
- WOLFF Et., HAFFEN K. — *Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires in vitro.* *Tex. Rep. Biol. Med.* 1952, 10, 463.
- YERGANIAN G. — *Cytologic map of some isolated human pachytene chromosomes.* *Amer. J. Human Genetics* 1957, 9, 42.
- YOSHIDA T. — *Studies on an ascites sarcoma of the rat.* *J. Nat. Cancer Inst.* 1952, 12, 947.
- *Chromosomal alteration and the development of tumors. I. A new subline of Yoshida sarcoma developed by chromosomal mutation.* *Z. Krebsforsch.* 1959, 63, 209.
- YOSHIDA T.H., TABATA T. — *Karyological study on the normal somatic and malignant tumour cells in the human.* *Ann. Rep. Nat. Inst. Genet. (Japan)* 1957, 8, 25.
-

TABLE DES MATIÈRES

<i>Introduction</i>	1
<i>Techniques générales de culture cellulaire appliquées à l'étude des chromosomes :</i>	
I. - Les réceptifs	5
II. - Les milieux	6
III. - Les types de culture utilisés	12
IV. - L'accumulation des mitoses	14
<i>Technique générale d'histologie appliquée aux études de chromosomes</i>	16
<i>Les chromosomes en culture de cellules :</i>	
I. - La cellule normale	19
II. - Le caryotype humain normal	21
III. - Anomalies constatées sur les explants primaires de tissu sain	23
IV. - Les mitoses dans les tissus et les explants primaires de tissu cancéreux	24
V. - Anomalies constatées dans les cellules de souche humaine, cancéreuses ou non,	
1°) Crigine et évolution des cellules de souche	23
2°) Modifications acquises du caryotype	29
3°) Anomalies chromosomiques des cellules de souche cancéreuse	31
VI. - Tentative d'interprétation des anomalies observées	35

Travaux personnels :

I. - Technique de culture	39
II. - Technique histologique d'étude des chromosomes	44
III. - Résultats :	
A - Morphologie des chromosomes des cellules étudiées	46
B - Nombre de chromosomes	46
C - Caryotype des cellules	47
a) Difficulté du classement des chromosomes	47
b) Variabilité des caryotypes	48
c) Présence de nombreux chromosomes de certaines variétés	49

Illustrations :

— Schéma de la molécule d'ADN	20
— Caryotype humain normal	22
— Endoreduplication (cellule Hep ²)	38
— Cellules de souche HeLa	51
— Cellules de souche Hep ²	56

Conclusions	65
-------------------	----

Bibliographie	69
---------------------	----



